



Optimisation de nanostructures plasmoniques pour la détection et la caractérisation structurale des protéines par Diffusion Raman Exaltée de Surface

Maximilien Cottat

► To cite this version:

Maximilien Cottat. Optimisation de nanostructures plasmoniques pour la détection et la caractérisation structurale des protéines par Diffusion Raman Exaltée de Surface. Physique [physics]. Université Paris-Nord - Paris XIII, 2014. Français. NNT : 2014PA132049 . tel-01277166

HAL Id: tel-01277166

<https://theses.hal.science/tel-01277166>

Submitted on 22 Feb 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Paris 13-UFR SMBH

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

T H E S E

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS 13

Discipline: Physique

Présentée et soutenue publiquement par

Maximilien COTTAT

Le 12 Décembre 2014

Optimisation de nanostructures plasmoniques pour la détection et la caractérisation structurelle des protéines par Diffusion Raman Exaltée de Surface

Directeurs de thèse: Dr. Christine Le Roy et Pr. Marc Lamy de la Chapelle

JURY

Pr. Dominique Barchiesi	Université de Technologie de Troyes	Président
Dr. Sophie Lecomte	CNRS-Université Bx1-IPB	Rapporteur
Pr. Nordin Felidj	Université Paris 7	Rapporteur
Pr. Olivier Oudar	Université Paris 13	Examineur
Pr. Xavier Troussard	Université de Caen	Examineur
Dr. Christine Le Roy	INSERM	Co-directrice de thèse
Pr. Marc Lamy de la Chapelle	Université Paris 13	Co-directeur de thèse
Dr. Nathalie Lidgi-Guigui	Université Paris 13	Encadrante

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail. J'adresse mes remerciements au docteur Sophie Lecomte, qui a pris le temps de rapporter ce travail de thèse. Je tiens à remercier le professeur Nordin Felidj, qui a également accepté d'être rapporteur. Je remercie le professeur Dominique Barchiesi pour avoir accepté d'évaluer ce travail en tant qu'examineur. Je souhaite remercier le professeur Olivier Oudar pour avoir accepté d'examiner mon travail. Je remercie le professeur Xavier Troussard, qui a accepté de faire partie de ce jury en tant qu'examineur.

Je remercie le professeur Véronique Migonney et le docteur Nadine Varin-Blank, respectivement directrice du laboratoire CSPBAT et directrice du laboratoire ASIH, pour m'avoir permis de réaliser ma thèse dans leurs unités.

Je suis très reconnaissant envers le docteur Christine Le Roy qui a été ma co-directrice de thèse. Je la remercie pour tout le temps consacré et surtout la patience dont elle a fait preuve dans la transmission de ses connaissances de biologiste. Cela n'a pas toujours été de tout repos de discuter avec un physicien, tel que moi, pour qui la biologie était un nouveau monde très complexe. Il l'est beaucoup moins aujourd'hui tout en étant bien plus attrayant. Je vous remercie également pour toutes nos discussions scientifiques, ainsi que pour toutes les autres. Vos précieux conseils m'ont toujours été d'une grande aide, que ce soit pour la réalisation des expériences ou pour les présentations de mon travail.

J'exprime mes sincères remerciements au professeur Marc Lamy de la Chapelle qui a été mon co-directeur de thèse. Je le remercie pour la confiance qu'il m'a accordée durant ces trois années, au cours desquelles il m'a énormément appris, de par ses connaissances ainsi que par sa rigueur. Merci pour la disponibilité que vous m'avez accordée. Je le remercie également de m'avoir donné la chance et la possibilité de présenter mon travail de thèse lors de conférences nationales et internationales. Dans le cadre du projet européen Nanoantenna, j'ai eu l'opportunité de travailler à l'étranger et de voir leurs méthodes de travail, pour cela aussi je lui dis un grand merci.

Je tiens également à remercier mon encadrante, le docteur Nathalie Lidgi-Guigui. Je lui suis reconnaissant du temps qu'elle m'a consacré, non seulement pendant ma thèse mais également durant mon stage de M2. Son soutien m'a permis de surmonter toutes les

difficultés qui se sont présentées durant ces années. Merci pour vos conseils et votre écoute qui m'ont été d'une grande aide pour mener à bien cette thèse.

Je souhaite également remercier le docteur Pietro Giusseppe Gucciardi qui m'a énormément appris au cours du peu de temps que nous avons partagé. Merci pour toutes les connaissances que vous m'avez transmises.

Je remercie le docteur Nicolas Guillot, qui était doctorant lors de mon arrivée au laboratoire CSPBAT, et qui m'a appris tous les petits détails (pour les expériences, la partie administrative, les enseignements, etc) qui permettent de gagner du temps et de se faciliter la vie.

Je tiens à remercier Maude Quettier, qui m'a été d'une aide précieuse pour mes débuts en biologie. Merci pour le temps passé à m'aider à préparer et réaliser mes expériences. Je remercie également Inga Tijunelyte pour toutes nos discussions scientifiques (pour la plupart), que se soit au laboratoire ou durant les pauses cafés.

Je voudrais aussi remercier tous les membres du laboratoire ASIH et de l'équipe SBMB du laboratoire CSPBAT, et plus particulièrement les docteurs Lionel Guittat, Laura Velazquez et Nadia Djaker, qui ont toujours été présents pour m'aider et me conseiller lorsque j'en ai eu besoin. Je n'oublie pas mes collègues doctorants, dont: Anouchka, Corentine, Florent, Hajer, Lamia, Néné, Sadequa, Stéphane et Vanessa, que je remercie pour tous les bons moments passés ensemble.

Je remercie les Dr. Edith Hantz, Horea Porumb et Bei Wen Sun pour leur aide dans la préparation de mes enseignements de mathématique et physique.

Enfin, je remercie ma famille qui m'a supporté durant toute cette thèse, merci pour votre soutien sans faille et à toutes épreuves.

Je terminerai ces remerciements en disant merci à toutes les personnes qui ne sont pas citées mais qui m'ont aidé et soutenu à réaliser cette thèse.

Abréviations

ADN: acide désoxyribonucléique (DNA: desoxyribonucleic acid, en anglais)

AFM: atomic force microscopy

ARN: acide ribonucléique

ARNm: acide ribonucléique messenger

ATP: adenosine triphosphate

BCR: B cells receptor

BPE: bipyridyl ethylene

BSA: bovine serum albumin

BT: benzenethiol

CIP: calf-intestinal alkaline phosphatase

CTAB: cetyltrimethylammonium bromide

DDA: discrete dipole approximation

DRES: diffusion Raman exaltée de surface (SERS: surface enhanced Raman scattering, en anglais)

EBL: electron beam lithography

ELISA: enzyme-linked immunoassay arrays

FDTD: finite-difference time-domain

FF: far field

FWHM: full width at half maximum

GNRs: gold nanorods

HO: harmonic oscillator

Ig: immunoglobulin

ITAM: immune receptors tyrosine-based activation motif

IR: infrarouge

IRM: imagerie par résonance magnétique

kDa: kiloDalton

LE: lithographie électronique

LOD: limit of detection

LNI: lithographie par nanoimpression (NIL: nanoimprint lithography, en anglais)

LNP: lithographie par nanosphères (NSL: nanosphere lithography, en anglais)

LLC: leucémie lymphoïde chronique (CLL: chronic lymphoid leukemia, en anglais)
MnSOD: manganèse superoxide dismutase
MSA: molecular surface area
NCs: nanocylinders
NF: near field
PDMS: polydiméthylsiloxane
PMMA: polyméthacrylate de méthyle
PS: plasmon de surface (SP: surface plasmon, en anglais)
PSL: plasmon de surface localisé (LSP: localized surface plasmon, en anglais)
QCM: quartz crystal microbalance
RMN: résonance magnétique nucléaire
RPSL: résonance des plasmons de surface localisés (LSPR: localized surface plasmon resonance, en anglais)
RS: Raman spectroscopy
SEM: scanning electron microscopy
SH2: Src homology 2
SOD: superoxide dismutase
Syk: spleen tyrosine kinase
UV: ultraviolet
WB: western blot

Table des matières

I. Introduction.....	1
II. Les protéines	3
II.1 Les structures protéiques.....	4
II.1.1 De la structure primaire à la structure quaternaire	4
II.1.2 Modulation des différents types de structure	8
II.1.3 Outils bioinformatiques et structures	9
II.2 Les fonctions des protéines.....	10
II.3 Structure-fonction de deux protéines: MnSOD et Syk	12
II.3.1 Manganèse SuperOxide Dismutase: MnSOD	12
II.3.2 Spleen Tyrosine Kinase: Syk	14
II.4 Technique d'analyses des structures protéiques.....	17
II.4.1 La diffraction des rayons X.....	15
II.4.2 La spectroscopie par résonance magnétique (RMN)	19
II.4.3 Les spectroscopies vibrationnelles	21
III. Des plasmons à la diffusion Raman exaltée de surface (DRES).....	24
III.1 Les plasmons	24
III.2 La diffusion Raman exaltée de surface (DRES).....	32
III.2.1 L'effet chimique	32
III.2.2 L'effet électromagnétique	33
III.2.3 Biocapteurs développés pour la DRES	35
IV. Les techniques de fabrication de nanoparticules	37
IV.1 Les colloïdes.....	37
IV.2 Les nanostructures sur surface	38
IV.2.1 Lithographie par nanosphères (LNS)	38
IV.2.2 Lithographie optique.....	39
IV.2.3 Lithographie par nanoimpression (LNI).....	40
IV.2.4 Lithographie électroniques	42
V. Objectifs de la thèse.....	45

VI. Résultats.....	47
VI.1 Détection de protéines grâce à la résonance des plasmons de surface localisé	48
Article 1: Localized surface plasmon resonance (LSPR) biosensor for the protein detection.....	50
Article 2: Study of gold nanorods–protein interaction by localized surface plasmon resonance spectroscopy.....	57
VI.2 Optimisation des nanostructures pour une détection par diffusion Raman exaltée de surface.....	65
Article 3: Evidence of the discrepancy between the near-field and the far-field using SERS.....	67
Article 4: A comparative study of the SERS limit of detection using gold nanocylinders and nanorods dimers fabricated by Electron beam and UV Nanoimprint lithography...	87
VI.3 Biocapteurs fabriqués par lithographie et utilisant la diffusion Raman exaltée de surface	101
Article 5: Soft UV nanoimprint lithography designed highly sensitive substrates for SERS detection	103
Article 6: High sensitivity, high selectivity SERS detection of MnSOD using optical nanoantennas functionalized with aptamers	109
VI.4 Etude de l'influence de la phosphorylation sur la structure de la protéine Syk	142
Article 7: Conformational analysis of the Syk protein by Surface Enhanced Raman Spectroscopy.....	143
VII. Discussion et perspectives	157
VIII. Conclusion	168
IX. Références.....	171

I. Introduction

Les protéines sont des molécules essentielles dans le développement et l'homéostasie des cellules. Leur mutation ou, un dérèglement de leur expression, ne leur permettant plus d'assurer leur fonction, entraîne les cellules sur une voie anormale qui peut entraîner l'apparition de maladies et de cancers. Ainsi, les protéines peuvent jouer le rôle de biomarqueurs dans de nombreuses pathologies. Le diagnostic ou le pronostic de certaines maladies se basent notamment sur la présence de plusieurs de ces biomarqueurs. Il est donc nécessaire d'avoir des outils et des techniques de détection spécifique. En dehors d'une haute spécificité, la détection d'un biomarqueur se doit également d'être sensible. En effet, la détection précoce de biomarqueurs (détection en faible concentration dans les fluides biologiques) au cours d'une maladie, ou avant l'apparition des symptômes de celle-ci, devrait permettre de développer des traitements plus ciblés tout en évitant d'attendre des stades graves de la maladie. A l'heure actuelle, pour répondre à cette problématique, la technique plus répandue consiste à doser une protéine biomarqueur par la méthode immuno-enzymatique ELISA (enzyme-linked immunoassay arrays). Malgré ces avantages (simplicité, sensibilité...), cette technique reste une méthode de mesure indirecte car elle ne permet pas l'identification du biomarqueur mais permet seulement l'observation de son interaction avec l'anticorps qui le reconnaît spécifiquement. Cette technique n'est donc pas exempte de biais de mesure liés aux interactions non spécifiques inhérentes à toute interaction biologique. Une méthode directe consisterait en la mesure d'un signal provenant directement du biomarqueur à détecter. Ce signal peut être sa signature spectrale Raman. En effet, le spectre Raman d'une protéine est unique et caractéristique de la protéine étudiée, ou plus généralement de la matière analysée et assure donc l'identification structurale de la protéine. Malheureusement, la section efficace de la diffusion Raman est très faible et induit donc un signal difficilement détectable. Pour observer de faibles concentrations de molécules, il est alors nécessaire d'augmenter le signal Raman par l'intermédiaire de la diffusion Raman exaltée de surface (DRES). Cette dernière méthode est basée sur l'exploitation des propriétés optiques des nanostructures métalliques. En effet, soumis à une excitation électromagnétique, les électrons libres du métal vont se mettre à osciller, créant ainsi un mode propre d'oscillation appelé plasmon. Dans le cadre de nanoparticules métalliques, ce dernier porte le nom de plasmon de surface localisé (PSL), car il est confiné dans la nanoparticule. Sous certaines conditions, ces

PSL peuvent entrer en résonance avec une onde électromagnétique excitatrice induisant ainsi la résonance des plasmons de surface localisés (RPSL), qui se manifeste à une longueur d'onde bien précise. La position de la RPSL est liée aux paramètres géométriques de la nanoparticule, mais également de son environnement immédiat. Par conséquent, la présence d'une protéine au voisinage de la nanoparticule entraîne un changement de l'environnement et donc de la position de la RPSL. Un autre avantage de la RPSL est qu'elle crée localement une exaltation du champ électromagnétique et elle va ainsi entraîner l'exaltation des processus optiques localement autour des nanoparticules. Cette exaltation locale peut ainsi induire l'exaltation de la diffusion Raman provoquant le processus de la DRES. Ces deux méthodes de mesures, RPSL et DRES, sont donc applicables à la conception d'un dispositif de biocapteur, destiné à la détection sensible et spécifique de biomarqueurs.

Ce manuscrit décrit le travail sur l'optimisation d'un biocapteur sensible, reproductible et spécifique. Avant de discuter les différents travaux, qui sont exposés sous forme d'articles, une introduction globale des protéines (structures et fonctions), de la RPSL, de la DRES ainsi que sur quelques techniques de fabrication des nanostructures sont détaillés dans ce mémoire. Ensuite, mes premiers travaux sur la détection de protéines grâce au décalage de la position de la RPSL, induit par les protéines, sont présentés. Puis, le développement d'un biocapteur utilisant la DRES est exposé. Dans ce but, une optimisation de différentes nanostructures (cylindres, bâtonnets) a été réalisée avant de les appliquer pour la détection de protéines. Deux techniques de production des nanostructures ont été considérées: la lithographie par nanoimpression et la lithographie électronique. Les biocapteurs développés à partir de ces méthodes de production ont été validés avec succès pour la détection de l'avidine, ainsi que pour la détection d'un biomarqueur, la Manganèse SuperOxide Dismutase (MnSOD), dont le niveau d'expression est associé à différentes pathologies. Au delà de la simple détection, nous avons également développé une application originale de la DRES dans le cadre de l'étude structurale des protéines. En effet, la fonction d'une protéine étant étroitement liée à sa structure, l'analyse structurale, en plus de leur taux d'expression ou de leur localisation dans la cellule, peut être un atout majeur dans la compréhension de la progression de certaines maladies. Ainsi, nous avons démontré qu'il est possible d'observer des variations de structure induites par certaines modifications post-traductionnelles en liant directement la protéine sur des nanostructures métalliques. Ainsi, le niveau d'activité de la protéine spleen tyrosine kinase, Syk, mesuré par Western Blot (WB), a pu être mis en lien direct avec sa structure identifiée par DRES.

II. Les protéines

Les organismes vivants sont constitués d'un nombre variable de cellules qui les définit comme des organismes unicellulaires ou pluricellulaires. Ils sont composés de cellules procaryotes, comme les bactéries, ou de cellules eucaryotes, comme chez l'homme, dont la principale différence par rapport aux cellules procaryotes réside dans la présence de membranes. Plus complexes, ces dernières cellules possèdent plusieurs organites, tels que le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, les mitochondries et un noyau contenant l'information génétique codée par l'acide désoxyribonucléique (ADN). A la base de toute cellule vivante, l'ADN est une molécule formée de deux brins, dont chacun est constitué d'une succession de nucléotides (l'adénine, la cytosine, la guanine ou la thymine). Complémentaires deux à deux (adénine avec thymine et cytosine avec guanine), l'association de ces nucléotides est à l'origine de la double hélice d'ADN, qui associée à des protéines (les histones) forme les chromosomes constitués de sous-unités, appelés les gènes. Chez l'homme, les 46 chromosomes présents dans chacune des cellules représentent environ 30 000 à 70 000 gènes, mais seulement 1 à 4% de la séquence d'ADN codent pour les protéines. L'expression des gènes en protéines passe par la transcription de l'ADN en acide ribonucléique (ARN), et plus particulièrement en ARN messager (ARNm), qui lui-même est traduit en séquence de résidus d'acides aminés composant les protéines. Ces dernières sont essentielles à la vie de la cellule car, par leur fonction, elles participent à la majorité des activités cellulaires qui permettent le fonctionnement normal d'un organisme. La fonction d'une protéine repose sur sa structure tridimensionnelle. Cette dernière est dépendante non seulement de sa séquence en acides aminés (ou chaîne polypeptidique) mais également de son environnement. Par conséquent, des modifications impliquant des résidus d'acides aminés de la séquence protéique, comme des mutations ou des phosphorylations, ou encore une localisation cellulaire différente de la protéine, peuvent induire des variations dans la fonction protéique. Ces variations fonctionnelles peuvent affecter l'activité et donc l'intégrité cellulaire. Ces perturbations structurelles et fonctionnelles d'une protéine peuvent entraîner l'apparition de syndromes, de maladies ou de cancers. Il est donc important de caractériser la structure des protéines afin de pouvoir définir leurs fonctions dans des contextes normaux et pathologiques.

II.1. Les structures protéiques

Une protéine est identifiée et caractérisée par sa structure qui se décompose en quatre niveaux (primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire). La structure primaire est définie par la séquence linéaire des résidus d'acides aminés de la chaîne polypeptidique tandis que la structure secondaire indique comment ces résidus entrent en interaction pour s'organiser en sous-structures locales. Les deux autres niveaux structurels que sont le tertiaire (agencement stable dans l'espace des différents repliements locaux) et le quaternaire (dans le cas d'une protéine formée de plusieurs sous-unités) donnent naissance à la structure tridimensionnelle de la protéine, et par conséquent définissent sa fonction. Les différents niveaux de structure étant liés entre eux, une variation de la structure primaire peut induire un changement de la structure tridimensionnelle d'une protéine et aboutir à la perte, ou à l'altération de sa fonction dans la cellule.

II.1.1 De la structure primaire à la structure quaternaire

La structure primaire est une représentation linéaire de l'enchaînement des résidus d'acides aminés composant la protéine. En 1951, Sanger et Tully ont été les premiers à déterminer expérimentalement la séquence, et donc la structure primaire, d'une protéine appelée l'insuline [1]. Transcrite puis traduite à partir du gène d'une cellule, cette séquence ordonnée et unique définit la structure et la fonction d'une protéine. Une étude des structures primaires de différentes protéines permet de regrouper ces protéines en famille moléculaire, donnant des informations sur leurs fonctions potentielles. Une comparaison des séquences d'acides aminés permet de définir des domaines ayant une même fonction. Tous les acides aminés, qui sont au nombre de 21, sont construits selon le même modèle structural. En effet, ils ont des groupes fonctionnels amine (NH_2) et carboxyle (COOH), ainsi qu'une chaîne latérale qui est propre à chaque acide aminé. La réaction entre le groupe amine d'un acide aminé et le groupe carboxyle d'un second acide aminé permet la création d'une liaison covalente, appelée liaison peptique. Cette réaction aboutit également à la création d'une molécule d'eau (H_2O) (Figure 1).

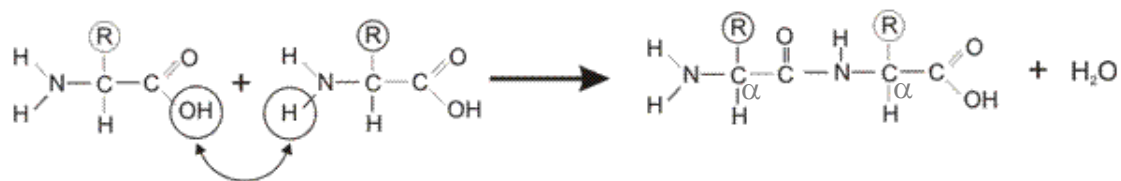


Figure 1: création d'une liaison peptidique entre deux acides aminés

L'ensemble des liaisons peptidiques, qui est généré au cours du processus de traduction de l'ARNm, donne ainsi naissance à une chaîne polypeptidique. Dans ce squelette (N-C_α-C), où C_α représente l'atome de carbone sur lequel se situe la chaîne latérale R (Figure 1), le premier acide aminé garde son groupe amine libre et correspond à la partie N-terminale de la protéine, alors que le résidu dont le groupe carboxyle est libre correspond à la partie C-terminale. D'autre part, plusieurs acides aminés sont composés d'atomes d'oxygènes (O) et d'hydrogènes (H) qui ne sont pas impliqués dans la liaison peptidique mais interviennent dans des liaisons hydrogènes (H-O) capables d'induire des repliements de la chaîne polypeptidique. En dehors de ces deux groupes (NH₂ et COOH), les chaînes latérales des résidus d'acides aminés jouent un rôle important sur les propriétés physicochimiques de la protéine et sont à l'origine de sa structure secondaire. En effet, les acides aminés étant par définition des molécules amphotères, c'est-à-dire qu'ils peuvent agir comme des acides et comme des bases. Lorsque l'acide aminé est à l'état de zwitterion, il est globalement neutre mais ses groupes terminaux sont chargés, son groupement C-terminal est chargé négativement alors que son groupement N-terminal est chargé positivement et que sa chaîne latérale est ionisable. Ces propriétés permettent la titration d'un acide aminé et le calcul des valeurs des constantes pK_a du COOH, du NH₃ et de la chaîne latérale tout en définissant la valeur du pH_i; pH auquel la charge de l'acide aminé est nulle. Les acides aminés sont également caractérisés par des valeurs attribuées sur l'échelle d'hydrophobicité de Kyte et Doolittle, avec l'arginine qui est très hydrophile ou l'isoleucine qui est très hydrophobe. L'ensemble de ces propriétés permet une classification des acides aminés qui sont regroupés en fonction de la nature de leurs chaînes latérales: aliphatique, hydroxylés/soufrés, cycliques, aromatiques, basiques et acides. Ils sont également classés en fonction de la polarité et de la charge des chaînes latérales à pH neutre. Par exemple, les acides aminés apolaires, qui sont hydrophobes, se trouvent généralement au cœur d'une protéine. Afin d'exclure tout contact avec le solvant aqueux, ces acides aminés se rapprochent les uns des autres pour créer des interactions hydrophobes. Ils participent ainsi à la formation des repliements locaux dans la structure

secondaire d'une protéine. A l'opposé, les acides aminés polaires sont généralement hydrophiles et sont situés au contact des molécules d'eau, à l'extérieur de la protéine. La polarité des acides aminés n'est pas le seul paramètre induisant des interactions entre eux. L'atome d'oxygène, à charge partielle négative, forme un dipôle électrique avec l'amine, à charge partielle positive.

La modélisation de la liaison peptidique démontre que les atomes d'azote (N), d'hydrogène, d'oxygène et de carbone (C) de la liaison peptidique sont coplanaires permettant un encombrement stérique minimal. Ce modèle donne une rigidité à la liaison peptidique qui conduit à un squelette défini et stable. De plus, les degrés de liberté de rotation des atomes aux extrémités de la liaison permettent l'adoption de différentes conformations dans l'espace. Ce modèle propose qu'il existe deux angles de rotation possibles. Le premier implique la liaison N-C $_{\alpha}$, qui représente le lien avec l'acide aminé précédent, et le second reliant l'acide aminé suivant, *via* la liaison C $_{\alpha}$ -C. Ces angles dièdres sont respectivement noté φ et ψ (Figure 2).

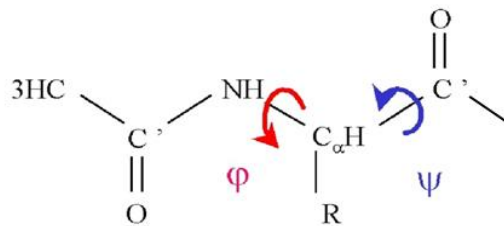


Figure 2: représentation des angles dièdres dans la chaîne polypeptidique

Toutefois, les valeurs des angles dièdres sont limitées et restreignent les rotations car ils ne sont pas tous énergétiquement favorables. Ramachandran et al. ont théoriquement déterminé différentes combinaisons possibles pour les angles φ et ψ [2]. Une représentation graphique, appelé diagramme de Ramachandran, indique trois zones favorables. En pivotant autour de ces angles, la chaîne polypeptidique s'oriente dans les trois directions de l'espace en autorisant des interactions entre acides aminés éloignés (liaisons hydrogènes, ponts disulfures, interactions de Van der Waal, etc). Par exemple, les liaisons hydrogènes potentielles entre résidus permettent la formation de différentes structures secondaires, comme les hélices α , les feuilletts β et les coudes.

Une protéine est donc composée de plusieurs structures secondaires reliées les unes aux autres. Les hélices α et les feuillets β représentent en proportion la majorité de la structure secondaire d'une protéine. C'est en 1951 que Pauling et Corey ont prédit l'agencement des acides aminés en forme d'hélices et de feuillets [3]. Expérimentalement, les hélices α ont été observées pour la première fois lors de la cristallisation de la protéine myoglobine [4] alors que les feuillets β ont quant à eux été identifiés grâce à la structure de la lysozyme [5]. Les hélices α sont obtenues par des interactions faibles entre les groupes NH et CO des acides aminés peu espacés et compris sur un segment continu. Les caractéristiques d'une hélice α comprennent l'existence de 3,6 résidus par tour [3, 6] (Figure 3.a) et des angles dièdres d'environ -65° et -40° (φ et ψ), respectivement. Ces hélices α constituent des structures en forme de bâtonnets et sont favorisées par des chaînes latérales ne portant pas de charge et dont l'encombrement stérique est faible. Concernant les feuillets β , ils résultent d'interactions faibles entre les groupes NH et CO des acides aminés de segments différents qui appartiennent à la même chaîne ou à des chaînes différentes. Une caractéristique des feuillets β est la valeur importante des angles dièdres φ et ψ qui sont en moyenne de -110° et 120° respectivement [7-9]. Deux types de feuillets sont distingués avec les feuillets β parallèles (Figure 3.b) et les feuillets β antiparallèles (Figure 3.c). On parle de feuillets β parallèles lorsque les chaînes superposées vont dans le même sens peptidique, et de feuillets β antiparallèles lorsque les chaînes adjacentes vont dans un sens peptidique contraire. Ces derniers sont plus stables car les liaisons hydrogènes subissent une plus faible distorsion. Les hélices α et les feuillets β sont reliés par des coudes, qui sont des conformations non répétitives à résidus polaires, permettent des changements de directions de la chaîne polypeptidique. Ils sont indispensables à la formation de feuillets β antiparallèles.

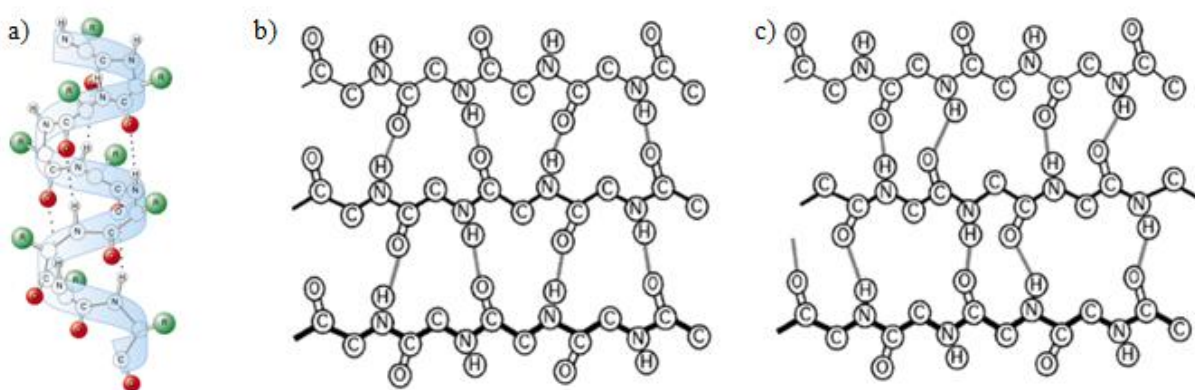


Figure 3: schéma a) d'une hélice α , b) d'un feuillet β parallèle et c) d'un feuillet β antiparallèle

L'enchaînement et le repliement des hélices α , des feuillets β et des coudes d'une chaîne polypeptidique conduisent à la formation de la structure tertiaire d'une protéine. Plus complexe que la structure secondaire, la structure tertiaire correspond à un agencement stable dans l'espace de la protéine. Cette structure permet à la protéine d'acquérir une fonction dans les cellules. La formation de cette structure implique différents types de liaisons. Ce sont des liaisons non covalentes, comme les liaisons hydrogène, et des liaisons covalentes, comme les ponts disulfure (S-S). Ces derniers mettent en jeu deux résidus cystéine liant leur atome de soufre (S) suite à une réaction d'oxydation. Pour être rompus, des agents réducteurs (par exemple le β -mercaptoéthanol) doivent être utilisés. Contrairement aux liaisons covalentes (liaisons fortes) que sont les liaisons peptidiques et les ponts disulfures, les autres liaisons, comme les ponts salins (liaisons ioniques entre groupement de charges de signes opposés), ou les liaisons hydrogène (interactions électrostatiques entre dipôles), peuvent être facilement rompues. En effet, la nature du solvant, la température, le pH ou encore les forces ioniques influencent la structure d'une protéine. De plus, la présence d'agents oxydants, réducteurs ou de détergents ont également une répercussion sur la structure tertiaire d'une protéine. Une perte de cette structure, appelée aussi conformation native d'une protéine car elle n'a subi aucune modification, entraîne une perte de la fonction de la protéine démontrant l'influence de l'environnement sur la structure tertiaire responsable de la fonction d'une protéine.

Un dernier niveau de structure protéique, le quaternaire, résulte de l'association de différentes protéines (sous-unités) aboutissant à un complexe protéique fonctionnel. Cette structure quaternaire met en jeu des liaisons covalentes et non covalentes (identiques à celles décrites précédemment) qui permettent l'association de sous-unités protéiques. Par exemple, la protéine d'hémoglobine fonctionnelle est constituée par l'association des sous-unités protéiques α et β .

II.1.2 Modulation des différents types de structure

Nous venons de voir que les différents niveaux de structures d'une protéine sont liés et font intervenir des liaisons non covalentes et covalentes entre résidus d'acides aminés d'une même chaîne polypeptidique, ou entre deux chaînes. Les structures des protéines sont modulées par des modifications post-traductionnelles, qui se définissent comme des événements biochimiques se déroulant sur une protéine après sa synthèse. Ces modifications

post-traductionnelles impliquent des modifications des caractéristiques d'un résidu d'acide aminé. Parmi plus de 400 modifications post-traductionnelles répertoriées, la phosphorylation d'un acide aminé est la plus étudiée. Elle est obtenue par l'interaction entre le groupe alcool des acides aminés et un groupe phosphoryle. Le transfert de ce groupe phosphoryle vers un résidu d'acide aminé se fait par une catégorie de protéine appelée les kinases. La plupart des modifications post traductionnelles étant réversibles, il existe une autre catégorie d'enzyme dont la fonction est d'enlever le groupe phosphoryle, ce sont les phosphatases. Pour les cellules eucaryotes, les résidus d'acides aminés concernés par la phosphorylation sont la sérine, la thréonine et la tyrosine, tandis que pour les cellules procaryotes ce sont l'histidine et l'acide aspartique. Le groupe phosphoryle étant doublement chargé négativement, sa présence engendre une perturbation électrostatique autour du résidu phosphorylé. La phosphorylation a alors un impact sur la structure locale ainsi que sur la structure globale de la protéine [10-12]. Elle augmente la stabilité de la structure par la création de ponts salins ou de liaisons hydrogènes à partir du résidu modifié [10, 11]. Elle induit des changements locaux de structure, qui peuvent provoquer un passage d'une structure ordonnée à une structure désordonnée, ou inversement, ainsi que des perturbations sur les hélices α [11, 12]. Mais la phosphorylation, comme les autres modifications post traductionnelles, n'affecte pas uniquement les structures secondaire et tertiaire, elle joue également un rôle important sur l'activité enzymatique de la protéine et sur sa capacité à interagir avec d'autres protéines [11].

II.1.3 Outils bioinformatiques et structures

En dehors des techniques expérimentales utilisées pour déterminer les structures des macromolécules biologiques, des outils bioinformatiques ont été développés pour les prédire. Des méthodes statistiques basées sur l'analyse de la fréquence des acides aminés présents dans certaines régions des protéines permettent de déduire la structure secondaire des protéines [6, 13]. D'autres modèles basés sur les propriétés chimiques (polarité, hydrophobicité, point isoélectrique, etc) sont également utilisés pour établir un lien entre la structure primaire et la structure globale [14, 15]. Ces techniques permettent donc de modéliser la structure d'une protéine, ainsi que l'agencement spatial des acides aminés. Par ailleurs, des études théoriques montrent que la phosphorylation entraîne des changements de structure et donc de la fonction de la protéine [16, 17].

Dans la section II.1, nous venons de discuter des différents niveaux de structures d'une protéine, des paramètres qui peuvent influencer sa structure globale. C'est cette structure tertiaire qui définit les fonctions de la protéine. Celles-ci sont nombreuses et variées. Dans la section suivante, nous allons en présenter quelques unes qui sont assurées par les protéines à l'intérieur des cellules.

II.2 Les fonctions des protéines

Dans les cellules, les protéines ont des rôles divers. On peut ainsi classer les protéines dans différentes catégories:

- les protéines de structure, qui donnent leur forme aux cellules
- les protéines de transport, qui permettent le déplacement de molécules
- les protéines régulatrices, qui contrôlent l'expression ou l'activité d'autres protéines
- les protéines de signalisation, qui transmettent un signal venant de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule
- les protéines motrices, qui permettent aux cellules de se déplacer

Les cellules, qu'elles soient eucaryotes ou procaryotes, maintiennent leur forme dans l'espace grâce aux protéines de structures. Celles-ci constituent le cytosquelette qui confère à la cellule ses propriétés mécaniques. Le cytosquelette est notamment à l'origine de la forme de la cellule ainsi que de son ancrage sur d'autres cellules *via* les membranes. Il peut être décomposé en trois catégories, des polymères de protéines: les filaments d'actines, les microtubules et les filaments intermédiaires. La formation ainsi que l'organisation de ces différents polymères sont assurées par d'autres protéines qui ne font pas parties de la catégorie des protéines de structure.

Le transport des molécules de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule, ou inversement, peut se faire par simple diffusion ou avec l'aide des protéines de transport. La diffusion des molécules se produit généralement lorsqu'il y a un gradient de concentration; la molécule allant de la zone la plus concentrée vers la moins concentrée. Les ions, qui sont de petites molécules, peuvent relativement facilement traverser la membrane, et par conséquent ne

nécessitent pas l'intervention de protéines. Les protéines de transport assurent deux types de transport: le transport passif qui ne nécessite pas d'énergie (canaux ioniques) et le transport actif, qui a besoin d'énergie. Elles permettent de maintenir un équilibre de charge, et donc de pH, entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. La majorité des protéines de transport est spécifique et ne peut transporter qu'un seul type de molécule.

Les protéines régulatrices contrôlent l'expression et l'activité d'autres protéines, ou encore divers paramètres intracellulaires. Par exemple la concentration d'agent oxydatif est contrôlée par les protéines de la famille superoxide dismutase, notamment la MnSOD (Manganèse SuperOxide Dismutase). Les protéines de régulation assurent par exemple un équilibre de l'expression des protéines, ainsi que de l'expression des gènes.

Les protéines de signalisation permettent la transmission d'un signal extérieur vers l'intérieur de la cellule, entraînant une réponse de celle-ci. Suite à une stimulation extérieure, comme la liaison d'une molécule sur un récepteur membranaire, les protéines de signalisation sont activées. Ces protéines permettent la propagation intracellulaire de cette stimulation en interagissant avec d'autres protéines. Cette cascade de signalisation est transmise du cytoplasme jusqu'au noyau où se situe l'ADN, et permet à la cellule d'interpréter la stimulation extérieure en induisant une réponse cellulaire appropriée. Durant ce processus, des modifications post traductionnelles des protéines de signalisation peuvent se produire afin de permettre des modifications de leur structure engendrant des changements fonctionnels comme leur capacité à interagir avec d'autres protéines. Ainsi, dans les cellules B stimulées, la protéine cytoplasmique Syk (Spleen Tyrosine Kinase) est phosphorylée et interagit avec d'autres protéines pour transmettre un signal.

Les protéines motrices permettent aux cellules de se déplacer. Elles sont capables d'utiliser une source d'énergie, comme l'ATP, pour produire un mouvement linéaire ou circulaire. Elles peuvent se fixer à une fibre, comme un filament d'actine, et se déplacer le long de son axe. La réplication et la transcription de l'ADN sont possibles grâce à la participation de protéines motrices qui se déplacent le long de la séquence.

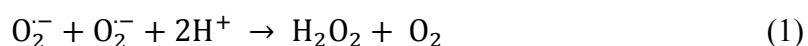
Les quelques fonctions présentées ci-dessus ne sont qu'un aperçu des différents rôles réalisés par les protéines. Si les protéines n'assurent plus leurs activités, le bon fonctionnement de la cellule est perturbé. Dans la section suivante, nous présentons les activités normales et altérées de deux protéines exprimées dans des cellules chez l'homme. La

première présentée est la protéine MnSOD, dont la fonction est d'agir contre le stress oxydatif. La seconde protéine est Syk, dont le rôle principal est de participer à la signalisation des récepteurs immuns. En dehors du contexte normal, ces deux protéines sont impliquées dans divers cancers et maladies.

II.3 Structure-fonction de deux protéines: MnSOD et Syk

II.3.1 Manganèse SuperOxide Dismutase: MnSOD

Chez les mammifères, la famille des SuperOxide Dismutase (SOD) regroupe trois protéines (SOD1: CuSOD, SOD2: MnSOD, SOD3: ecSOD) codées par différents gènes et localisées dans des compartiments cellulaires distincts. Elles catalysent la même réaction (1), à savoir la transformation d'anions superoxides ($O_2^{\cdot-}$) en oxygène (O_2) et en peroxyde d'oxygène (H_2O_2), qui implique la réduction et réoxydation d'un métal (« redoxactive transition metal ») comme le cuivre (Cu) ou le manganèse (Mn) sur le site actif de l'enzyme [18].



Chez l'homme, MnSOD est une protéine de 198 acides aminés (poids moléculaire de 22 kDa), et est constituée de trois domaines. Le premier cible la protéine dans la mitochondrie et les deux suivants forment le site actif de l'enzyme qui contient l'atome de Mn. La résolution de la structure cristalline de MnSOD montre qu'elle s'agrège en un tétramère où chaque monomère est lié à un atome de Mn (Figure 4) [19].

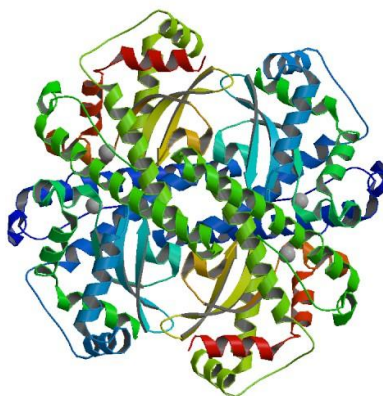


Figure 4: modèle cristallographique de la structure humaine de MnSOD [19]

Cette conformation structurale permet à la MnSOD, présente dans la matrice mitochondriale [20], de réguler la quantité de O_2^- dans la cellule (le O_2^- étant un oxydant très réactif et toxique [21, 22]). Dans les conditions physiologiques normales, MnSOD joue donc un rôle protecteur contre le stress oxydatif grâce à niveau d'expression de la protéine maintenu stable. Un dérèglement de la concentration en oxydants entraîne des altérations cellulaires par la formation de radicaux libres oxydés qui interagissent et détruisent les protéines, les lipides et l'ADN. En effet, une délétion du gène codant pour MnSOD chez la souris entraîne une létalité néonatale avec des anomalies du système cardiaque et des neurodégénérescences. Par ailleurs, une hausse de la quantité de MnSOD protège les tissus sains du stress oxydatif [23], ou augmente la résistance à la cytotoxicité des nécroses tumorales [24]. Différentes études indiquent une augmentation de la concentration en MnSOD dans le sérum de patients atteints de divers cancers [25-27]. De plus, l'implication de MnSOD a été établie dans l'accroissement de l'apoptose de cellule ayant un fort taux de lipoprotéines de basse densité, protéines qui jouent un rôle dans l'athérosclérose [28]. Ces résultats démontrent l'importance de MnSOD dans la survie des cellules. Cependant, une surexpression de MnSOD peut également mener à l'accumulation d'espèces réactives oxygénées et du stress oxydatif [29]. A l'inverse, d'autres travaux décrivent une inactivité de MnSOD, associée à une baisse de l'activité de SOD1, dans divers types de cellules tumorales [30]. L'ensemble de la littérature, apparemment contradictoires, ne permet pas de déterminer le rôle de la protéine MnSOD dans les divers contextes pathologiques, même si un dérèglement de son expression et/ou de son activité est impliqué.

II.3.2 Spleen Tyrosine Kinase: Syk

La protéine Syk est une enzyme dotée d'une activité tyrosine et sérine/thréonine kinase [31]. Cette fonction lui permet de phosphoryler les résidus tyrosine, sérine et thréonine de certaines protéines substrats, et de s'autophosphoryler. Comme décrit précédemment, la phosphorylation est une modification post traductionnelle qui influence la structure protéique et donc sa fonction (cf. section II.1.2). Syk est composée de 635 acides aminés lui conférant un poids moléculaire de 72 kDa. Sa structure primaire est composée de deux domaines Src homology 2 (SH2), de deux inter-domaines (A et B) et d'un domaine kinase (Figure 5). Les deux domaines SH2, séparés par l'inter-domaine A, permettent à Syk d'interagir avec les motifs tyrosines phosphorylés d'autres protéines. Cette capacité d'interaction joue un rôle prépondérant dans la propagation de signaux extracellulaires vers le noyau d'une cellule. Son domaine tyrosine kinase se situe dans sa partie C-terminale. Le second domaine SH2 est lié au domaine kinase par l'inter-domaine B, qui est délété de 23 acides aminés dans son isoforme, appelé Syk B [32].

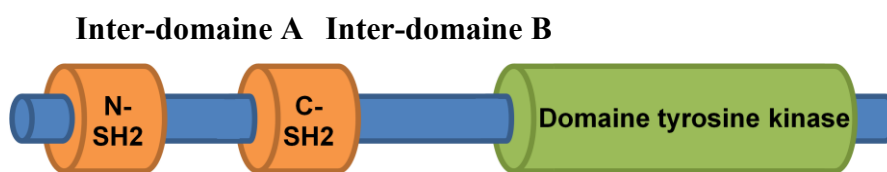


Figure 5: structure primaire de Syk

En accord avec un changement de structure des protéines induit par les modifications post-traductionnelles, que sont les phosphorylations, une approche de basse résolution utilisant la microscopie électronique a permis de mettre en évidence un modèle dans lequel Syk non phosphorylée et Syk phosphorylée ont des structures tridimensionnelles différentes [33]. Récemment, la structure tridimensionnelle de la séquence complète de Syk non phosphorylée a été obtenue suite à une diffraction des rayons X d'un cristal de cette protéine (Figure 6) [34].

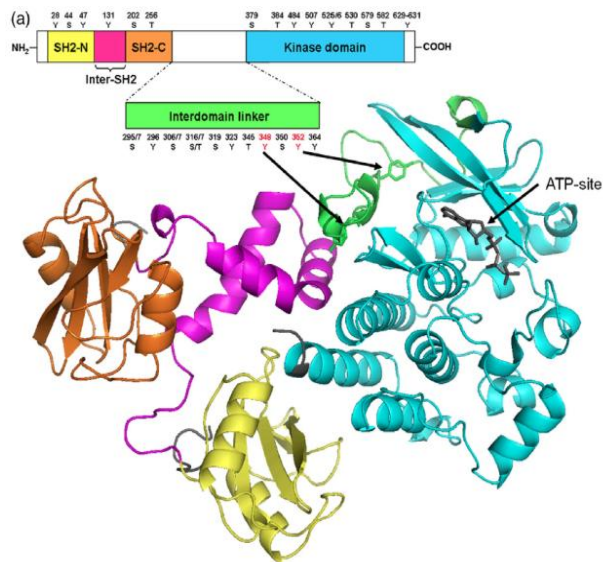


Figure 6: structure tridimensionnelle de Syk obtenue par diffraction des rayons X [34]

Cette approche méthodologique, qui possède une résolution spatiale de l'ordre de l'angström (10^{-10} m), montre que les acides aminés aromatiques présents dans les deux inter-domaines A et B, le domaine tyrosine kinase ainsi que l'extrémité carboxyterminale participent à la conformation auto-inhibée, c'est-à-dire que sa fonction kinase est inactive. Avant son activation, Syk existe donc dans une configuration auto-inhibée, dans laquelle elle est dépourvue de phosphorylation [35]. L'activation de Syk serait dépendante de l'engagement du tandem SH2. En réponse à une stimulation extracellulaire, comme un antigène, le récepteur situé à la surface de la cellule (par exemple le récepteur des cellules B ou BCR) change de conformation, active une kinase et aboutit à la phosphorylation de deux tyrosines sur les motifs ITAM (Immune receptors Tyrosine-based Activation Motif) [36]. En se liant au récepteur phosphorylé grâce à ses deux domaines SH2, Syk adopte une conformation « active » dans laquelle elle est capable de se trans- et/ou autophosphoryler [37, 38]. Une fois dissociée du récepteur et multiphosphorylée, Syk est capable de phosphoryler d'autres protéines tout en servant de plateforme d'ancrage à plusieurs protéines, permettant ainsi la propagation d'un signal de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule (Figure 7).

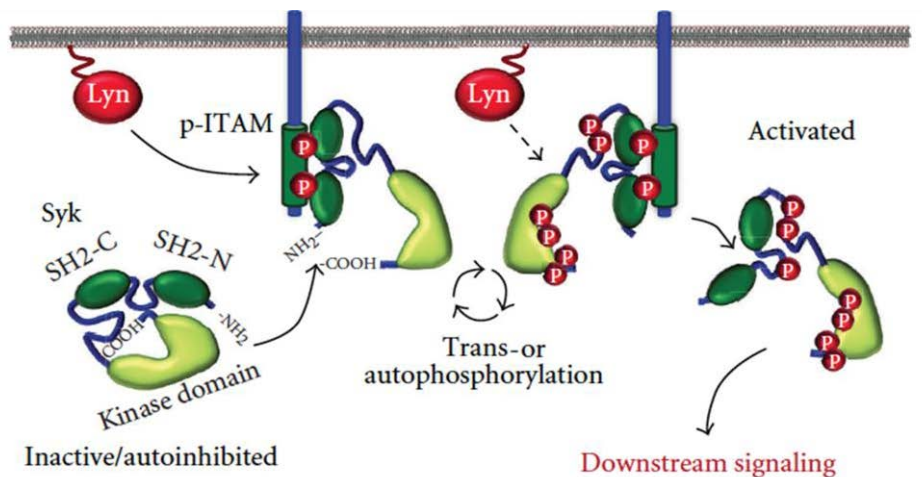


Figure 7: modèle d'activation de Syk (modifié de [38])

Ce modèle d'activation, basé sur les données de la littérature, montre que l'activité enzymatique de Syk dépend de son niveau de phosphorylation. Par ailleurs, certains résidus tyrosine phosphorylés sont importants pour l'interaction de Syk avec d'autres protéines de la voie de signalisation de l'antigène. Par exemple, la phosphorylation de la tyrosine en position 341 permet la liaison de Syk à Vav [39], la phosphorylation de la tyrosine 317 permet l'association de Syk à Cbl [35], la tyrosine 624 phosphorylée est, quant à elle, requise pour l'interaction de Syk avec la protéine SLP65 [35], et la phosphorylation des tyrosines 342 et 346 sont nécessaires à la liaison de protéine PLC γ 2 [35]. Ces interactions, induites par un même signal extracellulaire, aboutissent à des réponses cellulaires diversifiées mais appropriées selon le contexte cellulaire [35].

Intermédiaire de la signalisation des récepteurs immuns, Syk est largement exprimée dans les cellules hématopoïétiques où elle joue un rôle important dans le développement des cellules B, ainsi que dans leur survie [40]. Cette enzyme est également exprimée dans d'autres tissus [35]. Par conséquent, un dérèglement de l'activité enzymatique de Syk, ou de sa capacité à interagir avec différentes protéines, impacte sur le bon fonctionnement de la cellule.

A l'heure actuelle, chez l'homme, aucun patient n'a été décrit avec une mutation dans le gène codant pour Syk. Cependant, le taux d'expression de la protéine Syk peut être dérégulé dans certaines pathologies ou cancers [41]. Malgré son rôle biologique qui reste toujours énigmatique, Syk a été décrite comme un « suppresseur de tumeur » dans des cancers du sein métastasés où elle est sur-exprimée, alors qu'elle est « promoteur de tumeur » dans des hémopathies où elle est également surexprimée [41]. Par exemple, la leucémie lymphoïde

chronique (LLC) est une hémopathie fréquente dans le monde occidentale et qui reste incurable. Cette maladie est « hétérogène » dans sa progression, avec certains patients qui ne développent pas de symptômes, alors que d'autres évoluent rapidement avec une survie plus courte. Dans les cellules B de la LLC, Syk, qui participe à la propagation du signal du BCR, est retrouvée surexprimée par rapport aux cellules B normales [35, 42, 43]. De plus, son taux de phosphorylation, en réponse à une stimulation du BCR, est plus important dans les cellules B des patients évolutifs [43], ce qui suggère un rôle de son activité enzymatique, liée à son taux de phosphorylation, dans cette pathologie.

Les fonctions protéiques étant extrêmement sensibles à la structure, il est crucial de caractériser les différents niveaux de structures des protéines pour mieux comprendre leurs fonctions dans les cellules saines ou pathologiques.

II.4 Techniques d'analyses des structures protéiques

Comme nous l'avons vu dans les sections II.1 et II.3, les différents niveaux de structure d'une protéine sont liés les uns aux autres et définissent sa fonction. Il existe diverses techniques d'analyses en fonction de la nature de la structure protéique. La structure primaire étant définie comme un enchaînement de résidus d'acides aminés, elle est déterminée grâce au séquençage direct des chaînes polypeptidiques par les méthodes de Sanger [44] ou récurrente d'Edman [45], ou encore par spectrométrie de masse. Souhaitant nous concentrer sur la caractérisation des structures secondaires et tertiaires des protéines, ces techniques ne seront pas développées dans ce manuscrit. Les autres niveaux de structure, qui consistent au repliement de la séquence à l'échelle locale (secondaire) puis à l'échelle globale (tertiaire et quaternaire) d'une protéine, sont généralement étudiés par diffraction des rayons X, spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN), ou par spectroscopies vibrationnelles (Raman et infrarouge). La diffraction des rayons X et la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire sont deux approches qui permettent d'atteindre une résolution à l'échelle atomique, décrivant ainsi précisément les structures protéiques et leurs variantes, alors que les spectroscopies vibrationnelles apportent une information sur les acides aminés constituant les protéines ainsi que sur sa structure globale.

II.4.1 La diffraction des rayons X

La diffraction des rayons X est l'une des plus anciennes méthodes utilisées pour l'analyse des structures protéiques. Elle se base sur le principe de l'interaction des rayons X avec la matière. La matière analysée doit se présenter sous la forme d'un cristal pour qu'il y ait diffraction. Soumis à un faisceau de rayons X, les atomes composant le cristal vont les diffractés dans certaines directions de l'espace. Les interférences entre les rayons diffractés peuvent être soit constructives (fort signal) soit destructives (faible signal), en fonction de leur diffraction par les plans cristallographiques. Donc seules certaines directions de l'espace sont permises (interactions constructives) et vont donner un signal (Figure 8.a).

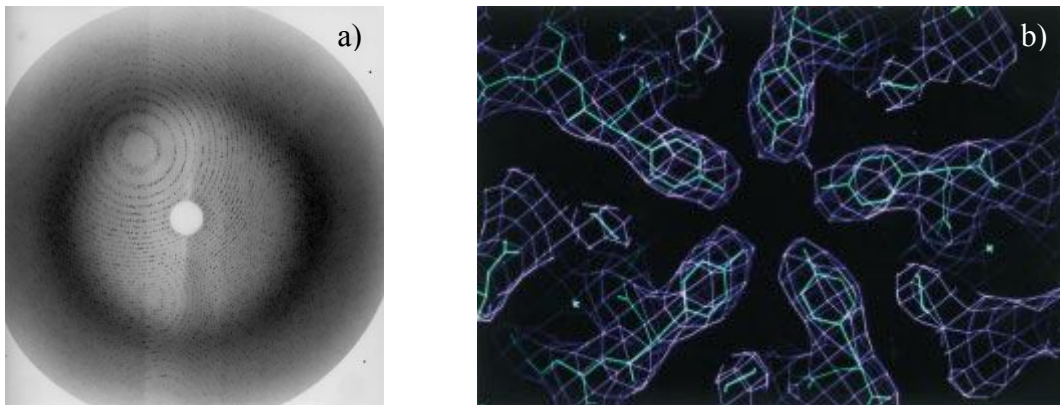


Figure 8: a) photo de la diffraction des rayons X permettant b) la fabrication d'une carte de la densité électronique [46]

Grâce à l'analyse des positions ainsi que de l'intensité des taches de diffraction des rayons X, une carte de la densité électronique est modélisée (Figure 8.b). Cette carte indique la position et la nature des atomes et sert de base pour la construction d'un modèle structural de la protéine. La résolution spatiale, et donc la qualité de la structure déduite du diagramme de diffraction, est directement liée à la longueur d'onde des rayons du faisceau incident. La longueur d'onde des rayons X (entre 10^{-11} et 10^{-8} m) étant du même ordre de grandeur que l'objet à étudier, il est alors possible d'atteindre des résolutions atomiques de l'ordre de 10^{-10} m. En 1958, Kendrew et al. ont pour la première fois caractérisé la structure d'une protéine (la myoglobine) grâce à la diffraction des rayons X [4]. Depuis, le nombre d'études de biomolécules basées sur cette méthode ne cesse d'augmenter. Cela a été possible grâce à l'amélioration des sources à rayons X, des logiciels d'analyses et des méthodes de cristallisation [47]. En plus de la résolution, la qualité de la structure déterminée par cette approche dépend de la pureté du cristal. Certaines protéines étant difficilement cristallisables,

plusieurs méthodes de cristallisation sont utilisées. Par exemple, le détergent joue un rôle important dans la cristallisation des protéines membranaires [48]. Des méthodes impliquant des modifications de compositions des protéines (suppression d'une partie de la séquence, ajout d'une étiquette pour la purification) sont également utilisées pour cristalliser les protéines [49-58]. Ces progrès ont rendu possible la détermination des structures de plusieurs milliers de protéines, ou domaines, ainsi que l'observation de changements de structures. La diffraction des rayons X permet également d'étudier des variations de phosphorylation induisant des changements de structure [59].

Cependant, la cristallisation peut induire des modifications de la structure d'une protéine. Il est également nécessaire d'avoir une quantité importante de protéine pour s'assurer d'une cristallisation efficace (les cristaux obtenus ont des dimensions de plusieurs centaines de micromètres en partant d'une solution de protéines ayant une concentration de l'ordre de 10^{-4} M). Les sources de production des rayons X, notamment les synchrotrons, permettent l'utilisation de rayons X ayant des énergies de plus en plus élevées. Ainsi, la dose absorbée par le cristal augmente et peut induire des dommages à la structure protéique (cassure des ponts disulfures par exemple [60]). Au phénomène de diffraction, une diffusion inélastique (diffusion Compton) peut s'ajouter. Lors de l'interaction entre les rayons X et un atome, les rayons X peuvent perdre une partie de leur énergie qui est alors transmise à l'atome qui éjecte un électron. Ce dernier (appelé photo-électron) peut alors casser des liaisons atomiques (S-H, O-H, N-H ou C-H) [60, 61]. L'ensemble de ces phénomènes a une incidence sur la structure de la protéine et sur la diffraction des rayons X, générant ainsi un modèle à partir de données partiellement biaisées. La diffraction des rayons X est donc une approche efficace pour analyser la structure et les variations de structure des protéines, mais il est important de prendre en compte les divers biais de mesures qui contribueraient au modèle structural.

II.4.2 La spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN)

C'est en 1946 que Bloch et Purcell pratiquèrent les premières expériences de spectroscopie RMN [62, 63]. Mais c'est seulement au cours des années 1980 que cette technique a été appliquée à la caractérisation de la structure des protéines. La spectroscopie

RMN, tout comme l'imagerie par résonance magnétique (IRM), exploite les propriétés magnétiques des noyaux atomiques. Ces propriétés magnétiques sont caractérisées par le moment cinétique de spin dépendant du nombre de protons et de neutrons qui compose le noyau. Soumis à un champ magnétique, une levée de dégénérescence des niveaux d'énergie des moments cinétiques se produit, c'est-à-dire qu'une énergie spécifique est nécessaire pour passer d'un niveau à un autre. L'excitation des atomes se fait par l'application d'un rayonnement radiofréquence, qui permet la transition entre deux états. Une fréquence spécifique, reliée à l'énergie de transition entre deux niveaux, est appelée fréquence de résonance. Cette fréquence de résonance dépend de la nature du noyau ainsi que de son environnement. En se basant sur l'analyse de ces fréquences, les liaisons atomiques et les positions des atomes sont déterminées. Les développements de la RMN [64], comme la RMN par transformée de Fourier [65], ont permis d'appliquer cette méthodologie à l'analyse de la structure tertiaire des protéines [66-68]. La RMN est une technique de caractérisation très puissante mais la concentration en protéines doit être importante, (autour de 10^{-3} M), tout comme le volume d'analyse (quelques centaines de microlitre), ce qui implique une masse de protéine pure de l'ordre du mg. Un autre paramètre important est le milieu dans lequel les protéines sont diluées. Généralement, les protéines sont diluées dans de l'eau protonée, pour ne pas perturber le signal obtenu, ainsi qu'à un pH acide ou neutre, qui ne correspond pas toujours au pH physiologique dans lequel elles se trouvent. Le spectre obtenu est également parfois difficile d'interprétation, surtout pour les protéines de haut poids moléculaire du fait du nombre conséquent d'atomes. L'analyse des résultats peut alors s'avérer longue et compliquée.

La diffraction des rayons X et la spectroscopie RMN nécessitent un soin particulier de préparation des protéines ainsi que des conditions de mesures particulières. Il est également nécessaire d'avoir une grande quantité de protéines afin de pouvoir analyser leur structure. D'autres approches techniques, comme les spectroscopies Raman et Infrarouge (IR), sont dotées d'un niveau de sensibilité plus élevé. Contrairement à la diffraction des rayons X ou à la spectroscopie RMN, les mesures sont directes et ne requièrent pas de préparation préalable des protéines, qui pourrait provoquer une modification de leur structure. De plus, ces spectroscopies sont non destructives, ce qui signifie qu'après l'analyse des protéines, ces dernières peuvent être testées pour leurs fonctions biologiques par une autre approche.

II.4.3 Les spectroscopies vibrationnelles

Les spectroscopies vibrationnelles, comme l'absorption Infrarouge (IR) et la diffusion Raman, sont basées sur les interactions inélastiques entre la lumière et la molécule, ou la protéine (échange d'énergie entre la lumière et la molécule). Du point de vue de la molécule, cet apport d'énergie est utilisé pour faire vibrer les différentes liaisons interatomiques. Cette énergie dépend donc de la nature des atomes qui composent la liaison, mais également de l'environnement de ces atomes. Chaque molécule ayant des liaisons spécifiques du fait de sa composition chimique, une molécule possède un spectre vibrationnel unique. Ainsi, il est possible d'identifier une molécule, ou une protéine, à partir du spectre obtenu.

Une analyse précise des spectres obtenus pour les protéines, notamment des bandes amides, permet de déduire leur structure. On dénombre neuf bandes amides (A, B et I à VII) qui trouvent leurs origines dans les vibrations des groupes de la chaîne polypeptidique (groupes C=O, N-H et C-N) [69]. La position et la forme des bandes amides I à III fournissent les informations les plus importantes sur la structure des protéines (détermination de la composition des hélices α , feuillets β , coudes). La bande amide I est caractéristique des liaisons C=O de la chaîne polypeptidique, dont les vibrations sont dépendantes de leur localisation spatiale et donc de la structure secondaire [69-73]. Ainsi, si la liaison est impliquée dans une hélice α , ou dans un feuillet β , la position et la forme de la bande change. La bande amide II est liée aux vibrations C-N (stretching) et N-H (bending) [69]. Elle est sensible aux coudes formés lors des repliements. Comme pour la bande amide II, la bande amide III est reliée aux liaisons N-H (stretching) et C-N (bending), mais les modes de vibrations sont différents [69]. Cependant, elle est sensible à la structure secondaire des protéines et peut être corrélée à la bande amide I [74]. En dehors des bandes amides qui donnent des renseignements directs sur la structure secondaire, d'autres liaisons importantes sont observables dans les spectres. Par exemple, la création d'un pont disulfure entre deux cystéines est caractérisée par l'apparition de pics spécifiques [75, 76]. Par ailleurs, les acides aminés possèdent des modes de vibration qui leur sont propres et sensibles à l'environnement [73, 77, 78]. L'étude des spectres apportent donc de précieux renseignements sur la structure des protéines.

La spectroscopie IR exploite l'absorption du rayonnement IR par les molécules, correspondant aux transitions directes entre les niveaux vibrationnels (Figure 9). Les

longueurs d'onde associées à ces transitions sont alors absentes dans la lumière transmise. Cette spectroscopie permet de déterminer le spectre d'absorption IR des molécules, mais également des protéines, qui leur est propre et unique [79]. L'absorption IR peut être augmentée lorsque la molécule est déposée sur une surface métallique nanostructurée [80, 81]. Le facteur d'exaltation peut atteindre 10^4 [82, 83] ou 10^5 [84] dans certaines conditions. Par cette méthode, les molécules, même en très faible concentration, peuvent être analysées sur le plan de leur composition et structure. Cependant, les mesures d'absorption IR ne peuvent être pratiquées en milieu aqueux car l'eau absorbe fortement les rayons de la gamme IR. Les analyses doivent être faites en condition sèche, ce qui peut avoir un impact sur la structure des protéines.

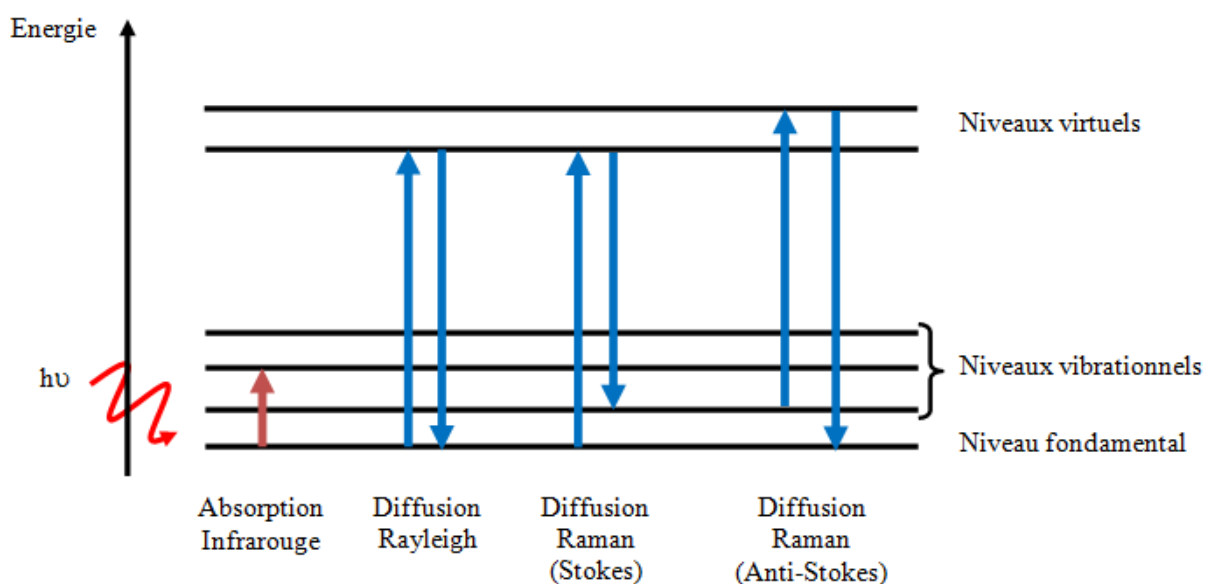


Figure 9: diagramme d'énergie pour les transitions infrarouge et Raman

La spectroscopie Raman exploite le même phénomène de vibration des liaisons interatomiques [79, 81, 85-87], mais certains modes de vibration sont actifs en Raman et inactifs en IR, et inversement. S'il n'y a pas d'échange, il s'agit de la diffusion élastique Rayleigh (Figure 9). Un échange d'énergie entre la lumière et la molécule induit une variation d'énergie des rayons lumineux, qui ont alors une longueur d'onde différente par rapport au faisceau lumineux incident. L'analyse de la différence de longueur d'onde entre le faisceau incident et le faisceau diffusé se traduit par un spectre ayant des pics à des longueurs d'ondes précises, correspondant aux différentes énergies de liaisons. Le processus Raman a été observé pour la première fois en 1928 [88, 89]. Une molécule soumise à une irradiation monochromatique (dans la gamme du visible) absorbe l'énergie des photons incidents. Cette

énergie est utilisée pour permettre aux liaisons de passer d'un mode fondamental à un état excité «virtuel». Cet état est dit virtuel car le temps de transition est trop court pour que la molécule y soit stable. La molécule se désexcite et retourne vers un niveau d'énergie inférieure. Les liaisons de la molécule se mettent alors à vibrer, ce qui fait que la molécule se trouve dans un état vibrationnel. La lumière diffusée par la molécule possède ainsi une énergie légèrement différente de celle de la lumière incidente. Cette variation d'énergie est la même que celle impliquée dans la spectroscopie IR puisque les énergies de vibrations sont dépendantes de la molécule et non de la source excitatrice. Si la molécule se trouve dans un état fondamental avant l'excitation, il s'agit d'une diffusion de type Stokes (Figure 9). Si la molécule se situe dans un état vibrationnel excité avant d'être excitée, il s'agit d'une diffusion de type anti-Stokes (Figure 9). Tout comme la spectroscopie IR, le spectre obtenu en spectroscopie Raman est unique et caractéristique de la molécule, ou de la protéine.

Les spectres de protéines obtenus par cette technique sont caractéristiques des acides aminés ainsi que de la structure secondaire [73]. Bien qu'il soit possible d'établir des structures protéiques grâce à cette approche [90-92], il est nécessaire d'avoir une quantité importante de la protéine (concentration de l'ordre du mM) car la section efficace Raman des protéines, qui correspond à la probabilité que le phénomène Raman se produise, est très faible. Pour contourner cet inconvénient, il est possible d'exalter l'intensité du signal de la diffusion Raman en déposant les protéines sur des surfaces métalliques nanostructurées. Ce phénomène d'exaltation du signal Raman est appelé la diffusion Raman exaltée de surface (DRES) et se base sur l'exaltation du champ électrique induite par l'excitation de la résonance des plasmons de surface localisés. Ce phénomène d'exaltation par les plasmons est décrit dans la section suivante.

III. Des plasmons à la diffusion Raman exaltée de surface (DRES)

III.1 Les plasmons

L'exaltation de la diffusion Raman, et donc de l'intensité du signal mesuré, est principalement due à une exaltation locale du champ électrique. Cette exaltation est le résultat de l'interaction entre une onde électromagnétique et une surface métallique nanostructurée. Dans cette partie, nous allons décrire cette interaction et de quelle façon celle-ci induit l'exaltation du champ électrique.

L'une des caractéristiques des métaux est la présence d'un gaz d'électrons libres qui peut osciller sous l'application d'une onde électromagnétique. Ces oscillations se produisent à une fréquence donnée et sont nommées oscillations plasma. Afin de mettre en évidence comment une onde électromagnétique produit cette oscillation plasma, il est important de comprendre comment cette onde interagit avec la matière, et plus particulièrement avec les électrons. Pour cela, nous allons considérer dans un premier temps le phénomène à l'échelle atomique, puis l'appliquer au domaine macroscopique.

L'interaction entre une onde électromagnétique et un atome est décrite par le modèle de Lorentz. Dans ce modèle, le système électron-noyau est considéré comme un oscillateur harmonique, c'est-à-dire que cet électron va osciller à une fréquence spécifique lorsqu'il sera soumis à l'effet de l'onde électromagnétique. Les forces qui s'appliquent sur l'électron sont:

- la force de Coulomb, liée au champ électrique dépendant du temps

$$F_C = -|e| E_0 e^{-i\omega t} = -|e| E \quad (2)$$

avec E_0 , l'amplitude du champ électrique E , $-|e|$, la charge de l'électron et ω , la fréquence de l'onde électromagnétique

- la force d'amortissement des oscillations (couramment appelé force de frottements visqueux), liée à l'interaction entre l'électron et le noyau

$$\mathbf{F}_a = -\gamma \dot{\mathbf{x}} \quad (3)$$

avec γ , la constante de viscosité et $\dot{\mathbf{x}}$, la vitesse de déplacement de l'électron

- la force de rappel, qui a pour effet de ramener l'électron à sa position d'équilibre et qui s'oppose au déplacement de l'électron induite par la force de Coulomb

$$\mathbf{F}_R = -\alpha \mathbf{x} \quad (4)$$

avec α , la constante de rappel et \mathbf{x} , le vecteur déplacement de l'électron par rapport à sa position d'équilibre

Nous allons appliquer le principe fondamental de la dynamique à l'électron de masse m et de charge $-|e|$. En considérant le champ \mathbf{E}_0 , comme linéaire et constant, ce qui correspond à l'étude du système selon une seule direction, la direction de déplacement de l'électron, \mathbf{x} , l'équation devient alors scalaire telle que:

$$m \ddot{x} = -|e| E_0 e^{-i\omega t} - \gamma \dot{x} - \alpha x \quad (5)$$

qui a pour solution:

$$x(t) = x_0(\omega) e^{-i\omega t} \quad (6)$$

avec

$$x_0(\omega) = \frac{|e| E_0}{m} \frac{1}{\omega^2 + i\omega\gamma_m - \omega_0^2} \quad (7)$$

où

- $\omega_0^2 = \frac{\alpha}{m}$, ω_0 représente la fréquence de résonance du système en absence d'amortissement

et

- $\gamma_m = \frac{\gamma}{m}$

Ceci nous montre que sous l'effet d'un champ électrique, l'électron se déplace par rapport à sa position d'équilibre, en fonction du temps. Ce déplacement implique une absence de charge au niveau de la position d'équilibre, ce qui peut être assimilé à une charge positive. Ceci induit l'apparition d'un dipôle selon la direction du champ électrique \mathbf{E} , caractérisé par

le moment dipolaire, $\mathbf{p} = -|e| \mathbf{x}$. En remplaçant \mathbf{x} par son expression (équation (6) et (7)), le moment dipolaire s'écrit:

$$\mathbf{p} = \frac{-|e|^2}{m} \frac{1}{\omega^2 + i\omega\gamma_m - \omega_0^2} \mathbf{E} \quad (8)$$

La polarisabilité, α , d'un dipôle a été définie comme, $\mathbf{p} = \alpha \varepsilon_0 \mathbf{E}$. D'après l'équation (8), nous pouvons en déduire que:

$$\alpha = \frac{-|e|^2}{m \varepsilon_0 (\omega^2 + i\omega\gamma_m - \omega_0^2)} \quad (9)$$

Cette polarisabilité est la réponse du système électron-noyau à une onde électromagnétique. La polarisation totale, \mathbf{P} , d'un matériau massif composé d'un nombre N de systèmes, électrons-noyau, par unité de volume, est décrite comme la somme de tous les moments dipolaires, soit:

$$\mathbf{P} = N \mathbf{p} = N \alpha \varepsilon_0 \mathbf{E} \quad (10)$$

Au niveau macroscopique, la polarisation \mathbf{P} d'un matériau s'exprime sous la forme:

$$\mathbf{P} = \chi \varepsilon_0 \mathbf{E} \quad (11)$$

avec χ , la susceptibilité électrique du matériau

La réponse totale du matériau, représentée par l'excitation électrique \mathbf{D} , est la somme de cette polarisation et du champ électrique incident, \mathbf{E} . \mathbf{D} est de la forme:

$$\mathbf{D} = \varepsilon_0 \mathbf{E} + \mathbf{P} = \varepsilon_0 (1 + \chi) \mathbf{E} = \varepsilon_0 \varepsilon_M \mathbf{E} \quad (12)$$

avec ε_M , la constante diélectrique du matériau, caractéristique de la réponse du matériau suite à l'excitation par un champ électrique

En combinant les équations (8), (10) et (12), il est possible d'exprimer ε_M en fonction de ω :

$$\varepsilon_M = 1 + \frac{N |e|^2}{m \varepsilon_0 (\omega_0^2 - \omega^2 - i\omega\gamma_m)} \quad (13)$$

L'équation (13) permet de déterminer la fréquence plasma, ω_p , qui correspond à la fréquence d'oscillation des électrons telle que:

$$\varepsilon_M = 1 + \frac{\omega_p^2}{(\omega_0^2 - \omega^2 - i\omega\gamma_m)} \quad (14)$$

$$\text{avec } \omega_p = \sqrt{\frac{N e^2}{m \varepsilon_0}}$$

D'après la formule (14), ε_M est complexe ($\varepsilon_M = \text{Re}(\varepsilon_M) + i \text{Im}(\varepsilon_M)$), donc on peut déterminer sa partie réelle et sa partie imaginaire:

$$\text{Re}(\varepsilon_M) = 1 - \omega_p^2 \frac{\omega^2 - \omega_0^2}{(\omega^2 - \omega_0^2)^2 + (\omega\gamma_m)^2} \quad (15)$$

$$\text{Im}(\varepsilon_M) = \omega_p^2 \frac{\omega\gamma_m}{(\omega^2 - \omega_0^2)^2 + (\omega\gamma_m)^2} \quad (16)$$

La partie réelle décrit la nature diélectrique ou métallique du matériau tandis que la partie imaginaire décrit l'absorption de la lumière par le matériau. L'absorption se traduit par un transfert d'énergie entre la lumière et le matériau, ce qui conduit à l'oscillation des électrons.

Nous venons de voir comment l'interaction entre la matière et une onde électromagnétique provoque un déplacement des électrons et ainsi l'apparition d'une oscillation plasma. Il a été montré que cette oscillation se produit pour certains niveaux d'énergies [93]. L'oscillation plasma est alors quantifiée et appelée plasmon. Dans un volume (métal dont les trois dimensions sont considérées infinies), la fréquence du plasmon est un multiple de ω_p .

Dans le cas d'une surface, le comportement des plasmons est différent du fait de l'interface entre le métal, et un diélectrique. Les champs électriques s'écrivent alors:

$$E_D = (E_{Dx}, 0, E_{Dz}) e^{i(k_{Dx}x + k_{Dz}z - \omega t)}, \text{ dans le diélectrique} \quad (17)$$

$$E_M = (E_{Mx}, 0, E_{Mz}) e^{i(k_{Mx}x + k_{Mz}z - \omega t)}, \text{ dans le métal} \quad (18)$$

La résolution des équations de Maxwell donnent ainsi:

$$k_{Dx} = k_{Mx} = k_x \quad (19)$$

$$\frac{k_{Dz}}{\varepsilon_D} + \frac{k_{Mz}}{\varepsilon_M} = 0 \quad (20)$$

$$k_x^2 + k_{Dz}^2 = \varepsilon_D \left(\frac{\omega}{c}\right)^2 \quad (21)$$

$$k_x^2 + k_{Mz}^2 = \varepsilon_M \left(\frac{\omega}{c}\right)^2 \quad (22)$$

On en déduit la relation de dispersion suivante:

$$\omega = c \left(\frac{\varepsilon_M + \varepsilon_D}{\varepsilon_M \cdot \varepsilon_D}\right)^{1/2} k_x \quad (23)$$

Cette relation traduit la propagation d'une onde électromagnétique à la surface du métal. Cette onde est appelée plasmon de surface délocalisé (PS). Pour que les PS existent, il faut qu'à l'interface entre le diélectrique et le métal, les vecteurs d'ondes ainsi que les fréquences des champs associés à la lumière et aux PS soient égaux (condition d'accord de plan). En d'autres termes, la courbe de dispersion de la lumière ($\omega_{lum}=c.k_{lum}$) et celle des PS (équation 23) doivent se croiser. Cette condition n'est pas remplie naturellement car la courbe de dispersion de la lumière est toujours située au-dessus de celle des PS. Pour parvenir à créer une intersection des deux courbes, il faut augmenter la valeur du vecteur d'onde de la lumière. Cela peut être réalisé avec un réseau ou avec un prisme (configuration Otto [94], ou Kretschmann [95]).

Dans le cadre de nanoparticules, du fait de leurs dimensions réduites, les plasmons de surface sont confinés dans la nanoparticule et ne peuvent pas se propager (Figure 10). Ils sont alors définis comme des plasmons de surface localisés (PSL). Pour certaines énergies, correspondant aux modes d'oscillation du gaz d'électrons, la lumière met en résonance les PSL (résonance des plasmons de surface localisés, RPSL).

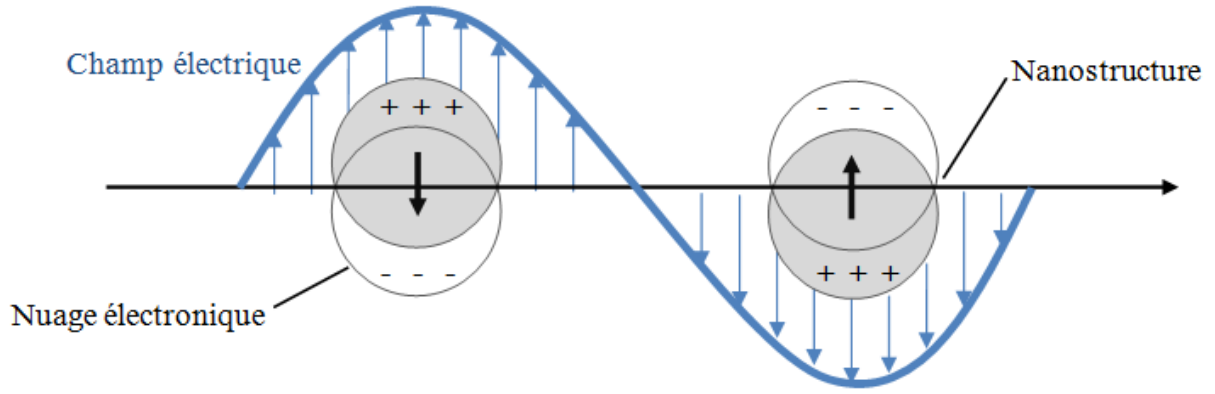


Figure 10: schéma de la résonance des plasmons de surface localisés

La RPSL peut être déterminée expérimentalement grâce à la spectroscopie d'extinction qui représente l'efficacité d'interaction entre la lumière et la nanostructure, le maximum étant atteint pour la RPSL. Celle-ci dépend de plusieurs paramètres dont la nature du métal, la taille et la forme des nanoparticules [96, 97], mais également du milieu dans lequel se situent les nanoparticules [98, 99]. La RPSL peut être déterminée théoriquement grâce à la théorie de Mie [100]. Cette théorie permet de calculer la section efficace d'extinction, σ_{ext} , de diffusion, σ_{diff} , et d'absorption, σ_{abs} , pour des nanoparticules sphériques. Dans le cadre de l'approximation quasi-statique, c'est-à-dire lorsque le diamètre de la nanoparticule sphérique est petit devant la longueur d'onde excitatrice λ , le champ électrique peut être considéré comme constant dans toute la nanoparticule. Dans ce cas, les expressions des sections efficaces sont:

$$\sigma_{abs}(\lambda) = 6\pi \frac{V}{\lambda} \text{Im} \left(\frac{\epsilon_M - \epsilon_D}{\epsilon_M + 2\epsilon_D} \right) \quad (24)$$

$$\sigma_{diff}(\lambda) = 24\pi^3 \frac{V^2}{\lambda^4} \left| \frac{\epsilon_M - \epsilon_D}{\epsilon_M + 2\epsilon_D} \right|^2 \quad (25)$$

$$\sigma_{ext}(\lambda) = \sigma_{abs}(\lambda) + \sigma_{diff}(\lambda) \approx \sigma_{abs}(\lambda) \quad (26)$$

La condition de RPSL est atteinte lorsque la section efficace d'extinction est maximale. Celle-ci étant liée à la longueur d'onde, il est possible de déduire immédiatement la position de la RPSL. Dans le cas présent, les PSL sont en résonance lorsque $\text{Re}(\epsilon_M) = -2\epsilon_D$, cette position de résonance ne dépendant que du métal et du milieu environnant.

Les expressions (24), (25) et (26) décrivent parfaitement ce qui se passe pour des nanoparticules ayant des diamètres allant jusqu'à 50 nm. Pour des nanoparticules de diamètres

plus important, l'approximation quasi-statique n'est plus valable et il faut ajouter des facteurs correctifs. La première correction est liée au champ électrique qui ne peut plus être considéré comme constant sur toute la nanostructure, car le diamètre de celle-ci n'est plus négligeable par rapport à la longueur d'onde excitatrice. Cela implique un déphasage qui modifie l'oscillation du nuage électronique, et qui est exprimé selon le terme de dépolarisation dynamique suivant:

$$- 4\pi^2 \left(\frac{r}{\lambda}\right)^2 \quad (27)$$

Le second terme correctif provient de la diffusion de la nanoparticule qui n'est plus négligeable par rapport à l'absorption. Cette diffusion diminue la polarisation de la nanostructure et donc amortit l'oscillation des électrons. Il se traduit par le facteur d'amortissement:

$$- \frac{16\pi^3}{3} \left(\frac{r}{\lambda}\right)^3 i \quad (28)$$

En tenant compte de ces deux facteurs, les expressions pour σ_{diff} et σ_{abs} deviennent:

$$\sigma_{\text{abs}}(\lambda) = 6\pi \frac{V}{\lambda} \text{Im} \left(\frac{\beta}{1 - 4\beta\pi^2 \left(\frac{r}{\lambda}\right)^2 - i\beta \frac{16\pi^3}{3} \left(\frac{r}{\lambda}\right)^3} \right) \quad (29)$$

$$\sigma_{\text{diff}}(\lambda) = 24\pi^3 \frac{V^2}{\lambda^4} \left| \frac{\beta}{1 - 4\beta\pi^2 \left(\frac{r}{\lambda}\right)^2 - i\beta \frac{16\pi^3}{3} \left(\frac{r}{\lambda}\right)^3} \right|^2 \quad (30)$$

Avec $\beta = \frac{\varepsilon_M - \varepsilon_D}{\varepsilon_M + 2\varepsilon_D}$

Ainsi, la résonance des PSL est atteinte lorsque:

$$\text{Re}(\varepsilon_M) = - \left(\frac{2 + 4\pi^2 \left(\frac{r}{\lambda}\right)^2}{1 - 4\pi^2 \left(\frac{r}{\lambda}\right)^2} \right) \varepsilon_D \quad (31)$$

Dans le cas présent, la RPSL dépend toujours du métal et de l'indice de réfraction du milieu environnant, mais également du rayon de la nanoparticule. Il devient également évident que si la forme de la nanoparticule varie (passage d'une sphère à une ellipse ou toutes autres formes anisotropes) cela va induire une modification des sections efficaces d'absorption et de diffusion, ainsi que de la position de la RPSL.

Pour des nanoparticules ayant des dimensions différentes dans trois directions (a, b, c), le facteur β des équations (29) et (30) varie et dépend de la direction (a, b ou c). On peut alors définir un facteur β_j spécifique pour chaque direction:

$$\beta_j = \frac{\varepsilon_M - \varepsilon_D}{3L_j(\varepsilon_M - \varepsilon_D) + 3\varepsilon_D} \quad (32)$$

avec L_j , le facteur de forme définit comme:

$$L_j = \frac{abc}{2} \int_0^{+\infty} \frac{dq}{(q+l_j^2)\sqrt{(q+a^2)(q+b^2)(q+c^2)}} \quad (33)$$

avec $l_j=a$ ou b ou c selon la direction considérée

et $L_a + L_b + L_c = 1$

Le paramètre β_j étant dépendant de la direction, les sections efficaces σ_{diff} et σ_{abs} en dépendent également. Les sections efficaces totales sont donc la somme des sections efficaces selon chaque direction, avec un facteur 1/3 (car trois dimensions différentes). Les sections efficaces varient d'une direction à une autre, donc la position de la RPSL varie aussi en fonction de la direction. Ainsi, pour une ellipse, il existe trois positions de résonance plasmon.

Quelque soit la forme de la nanoparticule, la section efficace d'extinction est maximale lorsque le paramètre β , ou β_j , est maximal.

Cette excitation des plasmons induit une exaltation du champ électrique autour de la nanoparticule. Ce facteur d'exaltation, G_{Loc} , du champ électromagnétique incident \mathbf{E}_0 , créant un nouveau champ électrique \mathbf{E}_i , est défini comme:

$$G_{\text{Loc}} = \left| \frac{\|\mathbf{E}_i\|}{\|\mathbf{E}_0\|} \right| \quad (34)$$

Le facteur d'exaltation décroît lorsque la distance, d , avec la nanoparticule augmente. Il est de la forme:

$$G_{\text{Loc}}(\lambda) = \frac{v}{2\pi(r+d)^3} |\beta|, \text{ pour une sphère} \quad (35)$$

$$G_{\text{Loc}}(\lambda) = \frac{v}{2\pi(j+d)^3} |\beta_j|, \text{ pour une ellipse} \quad (36)$$

De même que pour les sections efficaces, le facteur d'exaltation est maximal lorsque β est maximal, ce qui correspond à la condition de résonance des PSL.

Nous venons de présenter l'effet d'une onde électromagnétique sur des nanoparticules métalliques. Nous avons montré que la position de la RPSL dépend du milieu qui entoure les nanoparticules, et plus particulièrement de l'indice de réfraction. Cette position change si le milieu est modifié ou si des molécules se lient à leurs surfaces. Ainsi, l'analyse de la position de la RPSL peut servir à la détection de molécules et protéines, et ainsi être un moyen de mesure pour le développement d'un biocapteur [101-104]. D'autre part, nous avons montré que la RPSL exalte le champ incident, et peut ainsi être utilisée pour exalter la diffusion Raman. Dans la section suivante, nous allons montrer comment la RPSL augmente l'intensité du signal Raman, et permet la conception d'un biocapteur basé sur la diffusion Raman exaltée de Surface.

III.2 La diffusion Raman exaltée de surface

La DRES fut observée pour la première fois en 1974 par Fleischmann et al, qui mesura un important signal Raman pour de la pyridine déposée sur des électrodes d'argent rugueuses [105]. Il attribua cette augmentation d'intensité à la rugosité, qui induit une augmentation de la surface totale et ainsi le nombre de molécules absorbées sur la surface. Le lien entre l'exaltation du signal Raman, les plasmons de surface et le champ électromagnétique s'est fait progressivement [106, 107]. En fait, il a été mis en évidence que ce phénomène d'exaltation provient de deux contributions: un effet chimique et un effet électromagnétique [108-110].

III.2.1 L'effet chimique

L'effet chimique se produit lorsqu'il y a une interaction entre la molécule et la surface métallique. Une molécule adsorbée sur la surface métallique peut avoir une structure électronique modifiée. Ainsi, il a été montré que lorsque deux molécules, qui ont une polarisabilité similaire, ne donnent pas la même intensité DRES après leur adsorption sur une surface métallique nanostructurée [111]. Une explication à cette différence est la variation de la polarisabilité de la molécule par le transfert de charge entre le métal et la molécule. Ce transfert accroît la polarisabilité de la molécule et se traduit par une augmentation de l'intensité du signal Raman [108]. Cet effet est amplifié lorsque la surface métallique présente

des atomes isolés (adatoms) sur une surface plane [112]. Le facteur d'exaltation produit par l'effet chimique est "seulement" de l'ordre de 10^2 , soit bien plus faible que celui produit par l'effet électromagnétique [109], et est donc souvent négligé, même si sa contribution peut être essentielle à l'obtention d'un signal DRES.

III.2.2 L'effet électromagnétique

Nous avons vu que l'effet chimique provient de l'interaction électronique directe entre la molécule et le métal. Dans le cas de l'effet électromagnétique, ce sont les propriétés plasmoniques du métal qui sont mises en jeu. Dans le cadre des plasmons de surface délocalisés, le facteur d'exaltation théorique est du même ordre de grandeur que celui de l'effet chimique, à savoir 10^2 [113], mais le facteur mesuré est uniquement de 10 [114]. En revanche, dans le cadre des plasmons de surface localisés, le facteur d'exaltation mesuré expérimentalement peut atteindre 10^8 [115]. Nous nous focaliserons par la suite sur l'exaltation induite par les plasmons de surface localisés. Le modèle présenté ci-dessous se base sur les travaux de Wokaun [116].

Ce modèle décrit les deux phénomènes à l'origine de l'exaltation électromagnétique du signal. Le premier est l'interaction entre le laser incident et les nanostructures métalliques. Comme décrit dans la section III.2.1, cette interaction produit un champ électromagnétique local autour de la nanostructure, \mathbf{E}_{Loc} . Sous certaines conditions, ce champ est exalté par rapport au champ électromagnétique incident. Nous avons également montré que l'exaltation du champ incident, \mathbf{E}_0 , à la longueur d'onde λ_0 , par la RPSL peut être quantifiée par le facteur d'exaltation G_{Loc} (équation 34). On peut alors écrire le nouveau champ local comme:

$$\mathbf{E}_{\text{Loc}} = G_{\text{Loc}} \cdot \mathbf{E}_0 \quad (37)$$

\mathbf{E}_{Loc} va alors exciter la molécule localisée à la surface de la nanoparticule, et qui va diffuser un signal Raman à une longueur d'onde λ_R . Le champ diffusé par la molécule, \mathbf{E}_{diff} , s'écrit alors:

$$\mathbf{E}_{\text{diff}} = \alpha \cdot \mathbf{E}_{\text{Loc}} = \alpha \cdot G_{\text{Loc}} \cdot \mathbf{E}_0 \quad (38)$$

avec α la polarisation de la molécule.

Une des propriétés de la lumière diffusée est de se propager dans toutes les directions de l'espace. Ceci nous amène au second phénomène, qui est l'interaction entre la lumière diffusée Raman et la nanoparticule. Ce phénomène, appelé phénomène de re-radiation va induire une exaltation du champ \mathbf{E}_{diff} , telle que:

$$\mathbf{E}_{\text{DRES}} = G_R \cdot \mathbf{E}_{\text{diff}} = \alpha \cdot G_R \cdot G_{\text{Loc}} \cdot \mathbf{E}_0 \quad (39)$$

avec G_R , le facteur d'exaltation à λ_R

On en déduit l'intensité de la lumière diffusée par la molécule, I_{DRES} , est de la forme:

$$I_{\text{DRES}} = G_{\text{Loc}}^2 \cdot G_R^2 \cdot I_0 = G \cdot I_0 \quad (40)$$

où I_0 , représente l'intensité du signal Raman en l'absence de nanostructures, donc en l'absence d'exaltation. Le facteur d'exaltation final dépend des facteurs d'exaltation, G_R et G_{Loc} , qui sont associés aux longueurs d'ondes λ_R et λ_0 , respectivement. Cependant, si les deux longueurs d'ondes sont proches, il est possible de faire une approximation dans laquelle les deux facteurs d'exaltation sont presque identiques, $G_R \approx G_{\text{Loc}}$, et donc $G \approx G_{\text{Loc}}^4$. C'est pourquoi il est communément admis que l'intensité DRES collectée est proportionnelle à la puissance 4 du facteur d'exaltation du champ électromagnétique induit par les nanostructures.

La compréhension des différents effets d'exaltation a permis d'optimiser les surfaces métalliques utilisées. L'exaltation du champ électrique est primordiale pour augmenter l'intensité du signal Raman. Cette exaltation étant due à la RPSL, qui est excitée par le laser, il est nécessaire que la longueur d'onde du laser soit proche de la position de la RPSL des nanostructures afin d'exciter efficacement les PSL. Le phénomène de re-radiation est également important. Sachant que la longueur d'onde Raman est légèrement plus grande que la longueur d'onde laser, la position optimale de la RPSL se situerait entre les deux longueurs d'ondes λ_0 et λ_R [117-120]. Cependant, pour des longueurs d'ondes excitatrices proches de l'infrarouge, il a été montré que cette règle n'est plus valide [121-123]. Par ailleurs, pour des nanostructures anisotropes, la polarisation de la longueur d'onde excitatrice joue un rôle dans l'intensité du signal mesuré [120]. L'exaltation peut également être augmentée par le couplage de deux champs électriques. Si l'espace entre deux nanostructures est suffisamment faible, les champs électriques vont se coupler. Ainsi, le couplage de nanoparticules ou nanostructures permet d'augmenter l'exaltation [124-126]. Une optimisation de tous les paramètres permet la détection de molécule unique [127, 128].

Depuis les premières investigations sur les biomolécules, l'identification de protéines s'est développée de manière importante [91, 129-131]. De plus, il est possible d'observer des modifications post-traductionnelles aussi bien sur des peptides que sur des protéines. Des mutations [132, 133] ou la phosphorylation [134-136] induisent des spectres DRES différents. Une étude approfondie des signaux DRES permet de définir les liaisons moléculaires ainsi que de caractériser des bandes amides caractéristiques de la structure des protéines [137-139].

III.2.3 Biocapteurs développés pour la DRES

La diffusion Raman exaltée de surface est une technique très puissante pour l'identification et la caractérisation des structures des protéines en très faible concentration. Cependant, du fait de cette haute sensibilité, la solution à analyser doit être pure pour éviter les signaux « parasites » provenant d'autres molécules. Toutefois, cette approche peut être appliquée à la détection spécifique de protéines en milieux physiologiques grâce au développement d'un biocapteur basé sur la DRES. Les caractéristiques essentielles pour l'obtention d'un biocapteur performant sont la reproductibilité, la spécificité et la sensibilité.

La maîtrise des propriétés optiques des nanostructures garantit un contrôle de l'intensité DRES, et donc une reproductibilité de l'intensité du signal mesuré. La lithographie électronique est une technique qui assure le contrôle de tous les paramètres nécessaires à la fabrication de nanostructures utilisées pour la DRES. La seconde caractéristique (spécificité) peut être obtenue après une fonctionnalisation de la surface métallique. Cette fonctionnalisation consiste à déposer une molécule capable de se lier spécifiquement à la molécule d'intérêt tout en interagissant avec le métal. Par exemple, les molécules ayant un groupement thiol (SH) ont une forte affinité avec l'or et sont souvent utilisées pour la formation de monocouche sur une surface d'or. Enfin, la troisième caractéristique (sensibilité) est obtenue grâce à la DRES, qui permet de détecter une molécule unique.

La fonctionnalisation de la surface métallique à l'aide d'anticorps marqués permet la détection spécifique de protéines en solution [140, 141], en milieu physiologique [142] ou *in vivo* [143]. Avec de tels systèmes, les limites de détections sont inférieurs à 10^{-9} M. La surface métallique peut également être fonctionnalisée avec des molécules, pour la détection *in vivo* de molécules d'intérêt biologique, comme le glucose [144]. Un autre type de molécule permettant la détection spécifique de protéines sont les aptamères. Les aptamères sont des

séquences spécifiques d'ADN qui ont une forte capacité d'interaction spécifique avec une protéine cible. Ils sont utilisés pour piéger la protéine souhaitée présente dans des milieux complexes. Cette fonctionnalisation, couplée à une mesure DRES, a été démontrée pour des détections spécifiques [145-150]. La plupart de ces méthodes n'implique pas la mesure directe de la molécule cible, mais celle d'une autre molécule, liée à la molécule cible et qui possède un fort signal Raman. Un système qui est utilisé pour des mesures DRES directes de l'interaction entre la molécule cible et la molécule de liaison est le complexe avidine/biotine. Ce complexe démontre ainsi que l'interaction entre la protéine et sa molécule de capture est mesurable par DRES [151, 152].

Nous venons d'expliquer les différents critères nécessaires à la conception d'un biocapteur. Pour la sensibilité, la technique DRES a été montrée pour être appropriée. Une étape de fonctionnalisation de la surface métallique permet d'acquérir la spécificité requise. Enfin, la reproductibilité de l'intensité du signal DRES est assurée par les nanostructures. La technique de fabrication des nanostructures doit permettre d'obtenir des nanostructures semblables. Dans la section suivante, nous présentons plusieurs méthodes de fabrication qui remplissent ces conditions.

IV. Les techniques de fabrication de nanoparticules

Nous pouvons distinguer deux catégories de nanoparticules: les nanoparticules en solution, ou colloïdes, et les nanoparticules sur « substrat », que l'on nomme par la suite nanostructures; le substrat étant une surface en silicium ou en verre sur lequel seront produites les nanostructures métalliques. De manière générale, les colloïdes sont obtenus suite à une synthèse chimique alors que les nanostructures sont fabriquées par un procédé physique, nous ne considérerons que le processus de lithographique. Ces différentes approches permettent de contrôler la taille et la forme des nanoparticules, ces paramètres étant déterminants pour le contrôle des propriétés optiques des nanostructures.

IV.1 Les colloïdes

Il existe de nombreux moyens de production de colloïdes en solution [115]. Les deux principales méthodes de synthèse utilisées sont celles de Turkevich et de Brust. La méthode de Turkevich est basée sur la réduction des ions d'or par l'intermédiaire d'ions citrate [153], tandis que la méthode de Brust exploite la réduction de l'or à l'aide d'un composé de sodium en présence de deux phases non miscibles (eau-toluène) [154]. Actuellement, la fabrication des colloïdes est très bien maîtrisée, ce qui permet d'ajuster leurs propriétés optiques en fonction des besoins. De ce fait, ils sont largement utilisés pour la détection de molécules. L'utilisation des colloïdes pour la DRES a permis la détection de molécule unique [128] et également la détection de protéines [155]. Une caractéristique des colloïdes consiste en la possibilité d'obtenir des « points chauds ». Ces derniers sont des zones où les colloïdes sont extrêmement proches les uns des autres, permettant un recouvrement de leur champ électrique, induisant un champ beaucoup plus intense, et donc une intensité de signal DRES plus importante. Du fait de la présence inhomogène de ces points chauds, l'intensité du signal obtenu n'est pas reproductible d'une mesure à une autre. De plus, les colloïdes étant en solution, ils sont constamment en mouvement, ce qui peut également influencer la reproductibilité du signal mesuré. Par ailleurs, la forme et la taille des nanoparticules sont

stabilisées par l'ajout d'un surfactant. Ce dernier, qui recouvre totalement la surface, peut perturber la liaison entre les nanoparticules et la molécule à détecter.

IV.2 Les nanostructures sur surface

IV.2.1 Lithographie par nanosphères (LNS)

La lithographie utilisant des nanosphères a été proposée pour la première fois au début des années 1980 [156, 157]. La réalisation de nanostructures à l'aide de cette technique est rapide car elle comporte peu d'étapes (Figure 11).

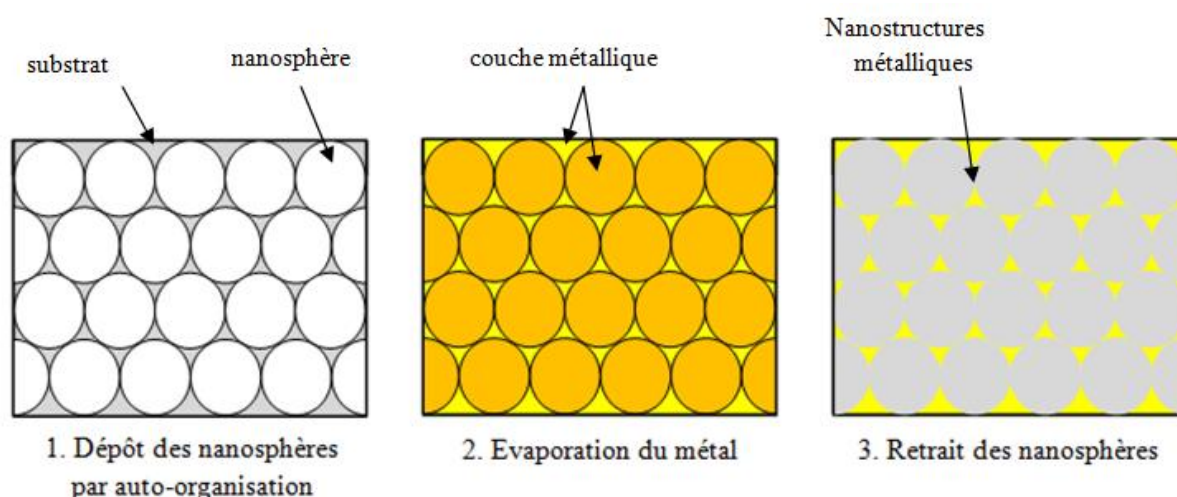


Figure 11: schéma des étapes de fabrication des nanostructures basée sur la LNS

Comme son nom l'indique, le principe de cette technique repose sur le dépôt de nanosphères sur une surface (étape 1, Figure 11). Le dépôt peut se faire de différentes façons, par « spin-coating » à faible ou haute vitesse, ou bien par simple dépôt d'une goutte contenant les nanosphères [158, 159]. Les matériaux utilisés pour les nanosphères sont le latex, la silice ou encore le polystyrène. En fonction des nanostructures voulues, le nombre de couche de nanosphères varie. Le dépôt d'une seule couche, comme présenté dans la figure 11, permet la fabrication de triangles, alors que la présence d'une seconde couche de nanosphères va produire des formes hexagonales [158, 160]. La seconde étape consiste en l'évaporation d'un

métal au dessus des nanosphères (étape 2, Figure 11). Lors de cette étape, il est possible de modifier l'angle de dépôt, en inclinant le substrat. Cette variation d'angle permet d'obtenir des nanostructures de plus faibles dimensions ainsi que de nouvelles formes de nanostructures (triangles superposés, chaînes de triangles) [160]. La taille des nanostructures est conditionnée par la taille des nanosphères et l'épaisseur de métal déposée. L'obtention des nanostructures se fait par le retrait des nanosphères par immersion de la surface dans un solvant et sonication (étape 3, Figure 11). Cette méthode de fabrication est peu coûteuse et peut ainsi être appliquée à grande échelle pour la production de surface nanostructurée.

IV.2.2 La lithographie optique

Le principe de la lithographie optique est l'illumination d'une résine photosensible à travers un masque, sur lequel les nanostructures sont imprimées (Figure 12).

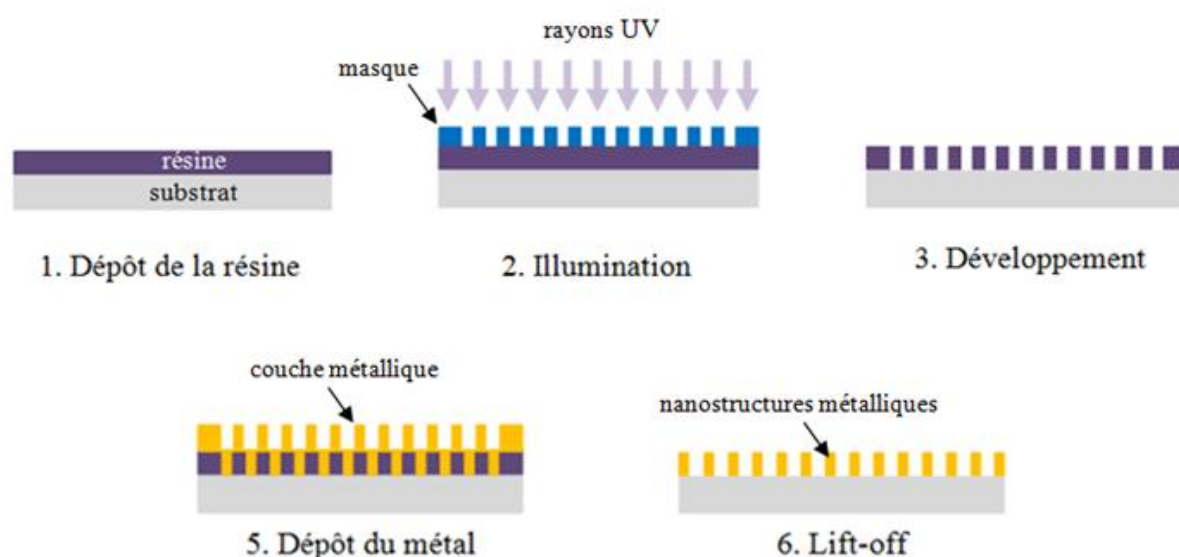


Figure 12: schéma des étapes de fabrication de nanostructures obtenues par lithographie optique

La résine la plus utilisée est la PMMA (polyméthacrylate de méthyle), qui est déposée sur le substrat par la méthode de « spin coating » (étape 1, Figure 12). Un masque est ensuite placé en contact avec la résine puis est suivi d'une exposition à la lumière (étape 2, Figure 12). Le support du masque doit être transparent aux rayons incidents tandis que le dessin des nanostructures absorbe ce faisceau. De manière générale, la résolution qu'il est possible d'atteindre est conditionnée par la limite de diffraction, la dimension des nanostructures étant

dans ce cas de l'ordre de $\lambda/2$ (λ étant la longueur des rayons incidents). Pour réduire les tailles des structures dessinées, une diminution de la longueur d'onde des rayonnements UV est nécessaire. La limite de diffraction ne peut pas être contournée si le masque est en contact avec la résine. Par contre, il est possible d'atteindre de meilleures résolutions grâce à l'ajout de lentilles entre le masque et la résine [161]. Un traitement chimique, appelé développement, est pratiqué afin d'enlever la résine irradiée (étape 3, Figure 12). L'étape du dépôt de métal, généralement par évaporation (étape 4, Figure 12), est effectuée avant que la résine restante ne soit supprimée par lift-off (étape 5, Figure 12). Cette technique permet de nanostructurer de grande surface en peu de temps. Cependant, les tailles, ainsi que la distance entre nanostructures sont limitées par le masque et la longueur d'onde du rayonnement utilisée. Par ailleurs, ces paramètres sont fixes car dépendants du masque; par conséquent un changement de forme ou de dimension des nanostructures nécessite la conception d'un nouveau masque.

IV.2.3 La lithographie par nanoimpression (LNI)

Contrairement à la lithographie optique dont la résolution dépend de la longueur d'onde du rayonnement, la résolution de la lithographie par nanoimpression dépend uniquement de la dimension des nanostructures dessinées sur le tampon. Cette technique, qui est récente, permet la création de nanostructures sur une grande surface en peu de temps. On distingue différentes méthodes de nanoimpression, mais deux d'entre elles sont principalement utilisées, une approche thermique (lithographie par nanoimpression thermique, LNI-T) [162] et une approche optique utilisant les rayons ultra-violets (lithographie par nanoimpression UV, LNI-UV) [163]. Les deux approches sont basées sur le même principe, seul le procédé de polymérisation de la résine change (Figure 13).

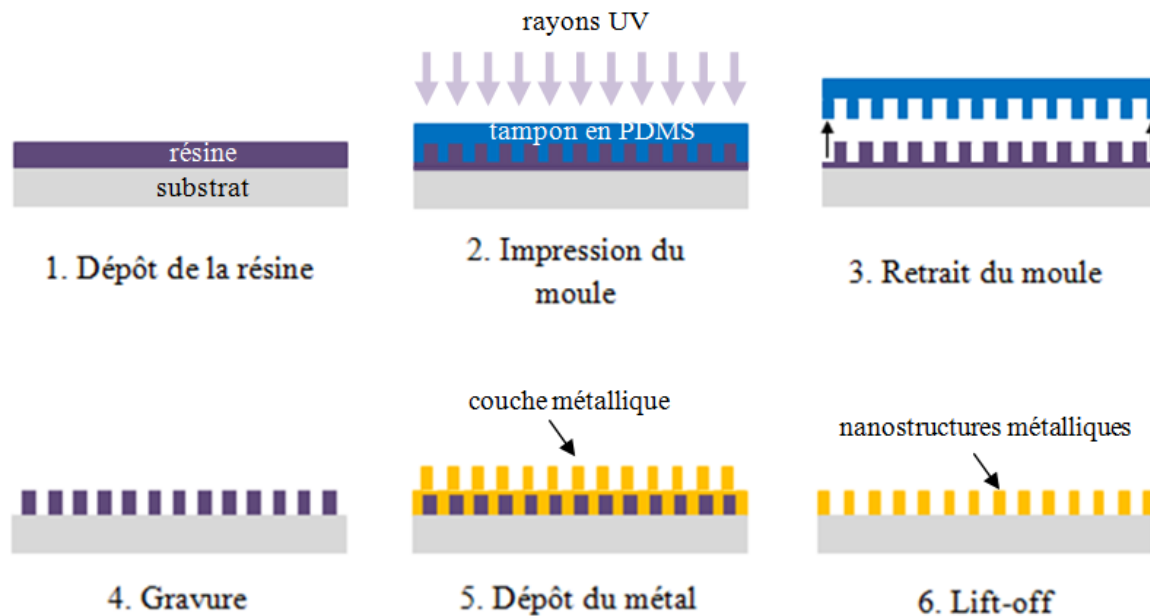


Figure 13: schéma des étapes de fabrication de nanostructures obtenues par LNI-UV

L'impression des motifs se fait à l'aide d'un tampon, qui est appliqué directement sur une résine déposée sur un substrat. Le tampon est généralement un polymère (le polydiméthylsiloxane, PDMS), car il constitue un matériau flexible et facile d'utilisation. De plus, il est transparent aux rayons UV. D'autres types de tampon sont utilisés, comme le h-PDMS (hard-PDMS), qui est plus dur que le PDMS et permet de produire des nanostructures de plus faibles tailles [164]. Le tampon est réalisé à l'aide d'un moule sur lequel se trouvent les nanostructures souhaitées, obtenues grâce à la lithographie électronique (cf. section IV.2.4). Les caractéristiques de la résine dépendent de la méthode utilisée. Pour la LNI-T, il est nécessaire d'avoir une résine thermosensible, tandis que la résine doit être photosensible pour l'utilisation de la LNI-UV [165]. Dans les deux cas, la résine est déposée par « spin coating » (étape 1, Figure 13). Les motifs du tampon sont transférés dans la résine lorsque celle-ci se solidifie, sous l'effet de la chaleur (LNI-T) ou sous exposition aux rayonnements UV (LNI-UV) (étape 2, Figure 13). Le tampon est alors retiré (étape 3, Figure 13) puis l'excès de résine, qui se trouve dans les trous, est supprimé à l'aide d'une étape de gravure (étape 4, Figure 13). L'étape de gravure est suivie d'une évaporation du métal (étape 5, Figure 13). Les nanostructures sont révélées grâce à un traitement chimique (« lift-off ») qui élimine le reste de la résine (étape 6, Figure 13). La LNI présente plusieurs avantages. En effet, un moule sert plusieurs fois et les temps de polymérisation de la résine sont généralement courts (quelques minutes). De plus, il est possible d'imprimer toutes les formes de nanostructures sur de

grandes surfaces [166]. Enfin, des résolutions de quelques dizaines de nanomètres sont réalisables grâce à cette technique, que se soit pour les dimensions des nanostructures ou pour les espaces entre nanostructures [167]. Cette résolution est uniquement obtenue grâce à la LNI-T. La lithographie par nanoimpression est donc une bonne alternative à la lithographie optique qui est limitée en résolution.

IV.2.4 La lithographie électronique

Dans le cadre de la lithographie optique, le faisceau utilisé pour modifier les résines est un faisceau de photons, mais la lithographie électronique met en jeu un faisceau d'électrons ou d'ions [168]. L'avantage des électrons par rapport aux photons est que leur longueur d'onde est facilement ajustable et beaucoup plus faible. En effet, un contrôle fin de leur énergie permet d'accéder à une très large gamme de longueurs d'ondes. L'utilisation des microscopes électroniques à balayage, qui assurent un contrôle du déplacement du faisceau d'électrons, autorise la création d'une grande variété de formes pour les nanostructures.

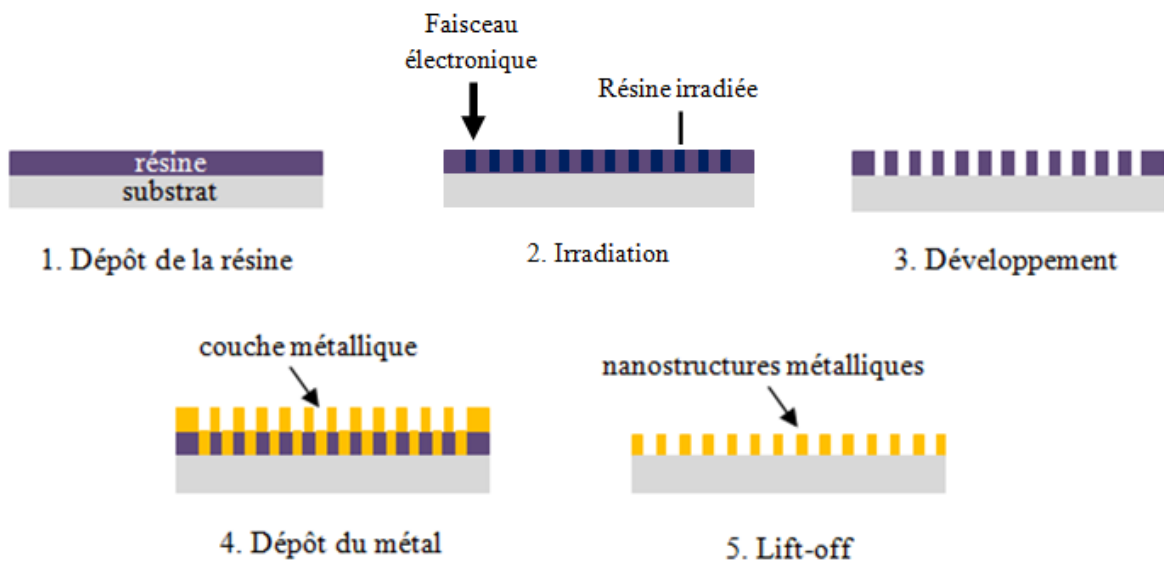


Figure 14: schéma des étapes de fabrication de nanostructures obtenues par lithographie électronique

Les étapes de fabrication sont pour la plupart identiques à celles de la lithographie optique (Figure 14). Dans un premier temps, une résine est déposée sur un substrat, par « spin coating » (étape 1, Figure 14). Différentes résines peuvent être utilisées, mais ces dernières se doivent d'être conductrices [169-171]. Si la résine est isolante, une fine couche métallique est

déposée sur celle-ci afin de la rendre conductrice pour pouvoir régler correctement le faisceau d'électron. La forme des nanostructures est tracée à l'aide du faisceau d'électrons (étape 2, Figure 14). Un développement chimique (étape 3, Figure 14) précède le dépôt de la couche métallique (étape 4, Figure 14). Les nanostructures sont dévoilées suite au lift-off (étape 5, Figure 14). Avec cette méthode de fabrication, il est possible de concevoir des formes cylindriques, ellipsoïdales [120], ou triangulaires [170]. La production d'anneaux [172], de carrés [173] ou encore en forme de croissant de lune [174], est également possible. Cette technique donne l'opportunité de réduire les distances qui séparent les nanostructures afin d'obtenir des espaces de quelques nanomètres, créant ainsi des points chauds.

Bien qu'étant un processus long, pour nanostructurer de grandes surfaces, et coûteux, la lithographie électronique est la technique la plus appropriée pour la fabrication de nanostructures ayant les formes et les dimensions souhaitées. Le contrôle de l'espace entre nanostructures est également maîtrisé.

V. Objectifs de la thèse

Les principaux objectifs de ma thèse consistent en la détection spécifique de protéines à l'aide d'un biocapteur et en la caractérisation structurale d'une protéine sous sa forme phosphorylée et non phosphorylée. Les travaux préliminaires pour mener à bien ces objectifs sont décrits ci-dessous.

Dans un premier temps, nous avons émis l'hypothèse d'un lien entre le décalage de la position de la RPSL et la détection et/ou l'identification des protéines sans préparation préalable des colloïdes. Le premier article présente une étude expérimentale et théorique de l'influence de protéines, ayant des poids moléculaires très variés, sur la RPSL des colloïdes en forme de nanobâtonnets. Les résultats de cette étude nous ont conduits à analyser les modes d'interaction entre les protéines et les nanoparticules. Le second article présente donc comment plusieurs protéines dont les structures diffèrent en fonction de divers paramètres, tels que le point isoélectrique, la concentration, l'impact des cystéines, interagissent avec les nanoparticules d'or.

Les résultats obtenus au cours des travaux décrits dans les deux premiers articles nous ont menés au développement de nanostructures pour la conception d'un biocapteur reposant sur la DRES. Dans ce contexte, des études sur différentes formes et tailles de nanostructures ont été réalisées. Le troisième article présente le travail d'optimisation des nanostructures en forme de nanocylindres, pour maximiser l'exaltation de la DRES en fonction des différentes longueurs d'ondes laser utilisées. Ces travaux ont été réalisés en combinant une approche expérimentale (mesure de l'intensité DRES pour différentes longueurs d'onde) et théorique (calcul par DDA pour expliquer et prédire les mesures expérimentales). L'article suivant, quant à lui, décrit la limite de détection expérimentale des nanostructures déterminées comme optimales. Cette étude a été effectuée par la mesure de l'intensité du signal DRES d'une molécule test, le benzenethiol, sur les différentes nanostructures (nanocylindres ainsi que des nanobâtonnets).

Suite à la mise au point des deux biocapteurs utilisant la DRES ont été développés. Le cinquième article expose la conception d'un biocapteur fabriqué par lithographie par nanoimpression UV pour la détection de l'avidine, suite à sa fonctionnalisation par la biotine. Les résultats du sixième article démontre qu'un biocapteur, fabriqué par lithographie

électronique et fonctionnalisé avec un aptamère, assure la détection spécifique de la protéine MnSOD, en solution et dans deux liquides physiologiques (sérum et salive).

La détection qualitative et/ou quantitative de protéines peut servir de facteurs diagnostiques ou pronostiques dans certaines pathologies. La fonction de ces protéines étant étroitement liée à leur structure, il est important d'étudier la relation entre la fonction et la structure d'une protéine. Le septième et dernier article décrit comment une modification post-traductionnelle telle que la phosphorylation influence la fonction et la structure de la protéine Syk.

VI. Résultats

VI.1 Détection de protéines grâce à la résonance des plasmons de surface localisés

L'exploitation de la résonance des plasmons de surface localisés des nanoparticules colloïdales a été réalisée pour la détection de protéines [175, 176]. En effet, la position de la RPSL est sensible à l'indice du milieu qui se situe immédiatement autour de la nanoparticule, celui-ci changeant en présence de protéines. Par conséquent, une protéine de haut poids moléculaire devrait induire un décalage plus important qu'une protéine de plus petit poids. De plus, suite à une fonctionnalisation de surface ils peuvent aussi être utilisés pour détecter spécifiquement des protéines [177, 178]. Dans ce cas, les biorécepteurs les plus souvent utilisés sont les anticorps qui sont eux-mêmes des protéines. Il est donc important de comprendre comment fonctionne l'interaction entre les protéines et les nanoparticules d'or, afin de pouvoir optimiser l'interaction entre la molécule cible et la surface fonctionnalisée.

Dans le but d'identifier les protéines, sans fonctionnalisation préalable des colloïdes, le premier article présente l'étude du décalage des RPSL de nanobâtonnets d'or lorsqu'ils sont en contact direct avec une solution contenant des protéines. Le décalage a été analysé pour six protéines, dont les poids moléculaires varient entre 6,5 à 75 kDa. Cette étude expérimentale a été accompagnée de simulations faites par FDTD (Finite Difference Time Domain) afin de compléter et d'expliquer les résultats expérimentaux. Nous montrons que la présence des protéines entraîne l'apparition d'un décalage de la RPSL le long du grand axe, mais pas selon le petit axe. Par ailleurs, le décalage moyen est constant quelque soit le poids moléculaire de la protéine étudiée. Les simulations faites par FDTD indiquent que les protéines interagissent aux extrémités des nanobâtonnets et que le recouvrement de la surface est le même pour toutes les protéines, d'où un indice de réfraction similaire et un décalage semblable. Cette étude nous a permis de mettre en évidence que le décalage de la RPSL des nanoparticules peut permettre une détection directe des protéines. Cependant, il n'est pas possible d'identifier les protéines les unes par rapport aux autres.

Lors d'une seconde étude, l'interaction entre quatre protéines différentes et des nanobâtonnets d'or a été analysée. L'effet de la concentration et du nombre de résidus cystéine (acide aminé contenant des groupes thiol qui ont une forte affinité avec l'or) des protéines ont été analysés. Nous démontrons que l'un des paramètres importants dans l'interaction entre les protéines et les nanoparticules d'or est le nombre de résidus cystéine

accessibles. En effet, si ce nombre est faible, les protéines se lient aux nanoparticules et il est possible de les détecter. De plus, pour des protéines différentes mais ayant une charge de même signe (négative), la liaison avec les nanobâtonnets d'or est supérieure pour la protéine possédant un seul résidu cystéine qui est facile d'accès par rapport à une protéine dépourvue de cystéine libre. Cependant, si le nombre de résidus cystéines accessibles est important, la protéine va interagir avec plusieurs nanoparticules, ce qui engendre une agrégation. Si les nanoparticules s'agrègent, la détection de la protéine cible sera moins efficace.

Article 1

Localized Surface Plasmon Resonance (LSPR) Biosensor for the Protein Detection

Maximilien Cottat, Néné Thioune, Ana-Maria Gabudean, Nathalie Lidgi-Guigui, Monica Focsan, Simion Astilean, Marc Lamy de la Chapelle

Plasmonics, 8:699-704 (2013)

Localized Surface Plasmon Resonance (LSPR) Biosensor for the Protein Detection

Maximilien Cottat · Néné Thioune ·
Ana-Maria Gabudean · Nathalie Lidgi-Guigui ·
Monica Focsan · Simion Astilean ·
Marc Lamy de la Chapelle

Received: 6 August 2012 / Accepted: 12 November 2012 / Published online: 21 November 2012
© Springer Science+Business Media New York 2012

Abstract In this paper, we investigate the ability of the gold nanorods (GNRs) to detect some proteins and demonstrate their potential to be used as plasmonic nanobiosensors. The GNRs were synthesized by a two-step seed-mediated growth procedure at room temperature. Firstly, a seed solution of gold nanoparticles was synthesized in the presence of cetyltrimethylammonium bromide surfactant and, subsequently, incorporated with appropriate amount of silver nitrate and tetrachloroauric acid solutions to grow GNRs with average length of 50 nm and diameter of 14 nm. We study the interaction of GNRs with proteins whose molecular weight varies from 6.5 up to 75 kDa. We investigate the resulting solutions by means of UV–vis absorption spectroscopy to determine the effect of the proteins characteristics on the shift of the localized surface plasmon resonance (LSPR). We show that for the case when proteins are in large excess compared to the GNRs concentration, whatever the protein is, the LSPR shift is constant and does not depend on the protein molecular weight. Moreover, we have been able to demonstrate that the sensitivity of such LSPR sensor is around 10^{-9} M/nm on a concentration range from 10^{-10} to 10^{-8} M. Some comparison with finite-difference time-domain simulations have also shown that the number of proteins adsorbed at the GNRs surface is around 40.

Keywords Localize surface plasmon resonance (LSPR) · Gold nanorods (GNRs) · Biosensor · Protein

Introduction

The development of reliable, sensitive, and specific biosensors is a very active research field. Among all of them, several groups have proposed the use of the localized surface plasmon resonance (LSPR) to detect molecules at very low concentration [1, 2]. Localized surface plasmon (LSP) is a collective oscillation of the free electrons inside a metallic nanoparticle and its energy depends strongly on the shape and the size of the nanoparticle [3–9]. Moreover, the LSPR position is highly sensitive to any change of the refractive index on the nanoparticle immediate environment [3, 5, 10–14]. Thus, any molecules, adsorbed at the nanoparticle surface induce a modification of the local refractive index and therefore a shift of the LSPR position [1, 15–20]. Several works have highlighted the advantages of the use of LSPR for the molecular detection and for sensor applications [1, 6, 7, 12, 13, 16]. The electromagnetic field produced by the LSP is largely more confined at the nanoparticle surface than in the case of delocalized surface plasmon produced on a flat surface (SPR system). The typical decay length of the LSP for a gold nanoparticle is close to 15 nm whereas it is close to 300 nm for flat surface [6]. LSP is thus more sensitive to any modification of the local environment than with SPR system. The LSP can be used to observe very low concentration of analytes and molecules of small weight. Detection limits at the zeptomolar level have been reported at the scale of the individual nanoparticle [7, 16, 17]. Moreover, since each nanoparticle is the site of one individual LSPR, it can be considered as an individual LSPR nanosensor and used to the miniaturization of sensing device. This technique is then very promising for the development of highly sensitive biosensor, especially in

M. Cottat · N. Thioune · N. Lidgi-Guigui ·
M. Lamy de la Chapelle (✉)
Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Laboratoire CSPBAT,
CNRS (UMR 7244), 74 rue Marcel Cachin,
93017, Bobigny, France
e-mail: marc.lamydelachapelle@univ-paris13.fr

A.-M. Gabudean · M. Focsan · S. Astilean
Nanobiophotonics and Laser Microspectroscopy Center,
Interdisciplinary Research Institute on Bio-Nano-Sciences,
Faculty of Physics, Babes-Bolyai University, T. Laurian 42,
400271, Cluj-Napoca, Romania

the field of diagnosis for the detection of identified diseases biomarkers such as proteins. It is then of first importance to determine the exact characteristics of their detection based on LSPR phenomenon.

In this paper, we will present the detection of various proteins using gold nanorods (GNRs) and their ability to be used as biosensor. The effect of the molecular weight of proteins (from 6.5a to 75 kDa) on the LSPR shifts was investigated experimentally and theoretically.

Experimental

Reagents

Tetrachloroauric(III) acid (HAuCl_4), ascorbic acid, and cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) were all purchased from Sigma-Aldrich, while silver nitrate (AgNO_3) and sodium borohydride (NaBH_4 , 99 %) were obtained from Merck. We used all chemicals as received. Aprotinin from bovine lung (ref. A1153), lysosyme from chicken egg white (ref. 62970), carbonic anhydrase from bovine erythrocytes (86.5 %, ref. c3934), and albumin from bovine serum (BSA; ref. a8806, 96 %) were purchased from Sigma-Aldrich. Ovalbumin and conalbumin (ref. W377206) have been provided by GE Healthcare. All proteins were dissolved in pure distilled water at a concentration close to 10^{-5} mol/L. Table 1 gives the detailed properties of the proteins used and their concentrations.

Synthesis of CTAB-Coated GNRs

For the synthesis of the GNRs in aqueous solutions a seed-mediated growth approach was employed. The gold seeds were first prepared by mixing 1 mL of 5 mM HAuCl_4 , 1 mL of 0.2 M CTAB, and 0.72 mL of freshly prepared ice-cold 1 mM NaBH_4 solution under continuous stirring. The resulting solution has a brownish–yellow color. Subsequently, the growth solution is obtained by mixing 6 ml of 1 mM HAuCl_4 with 6 ml of 0.2 M CTAB and 780 μL AgNO_3 4 mM. A 0.08 ml of 0.0788 M ascorbic acid was then added while gently stirring. Ascorbic acid acts as a mild reducing agent and changes the color of the growth solution from dark yellow to colorless. Finally, in order to start the GNRs growth, 0.014 mL of seeds were added into the as-prepared

growth solution. The color changed gradually in the first 15–20 min until finally stabilizing. The obtained CTAB-coated GNRs were then purified by centrifugation at 9,000 rpm for 10 min, twice, and then dispersed in ultrapure water for further use. Their concentration in raw solution calculated for a molar extinction coefficient of $3.4 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [21] was 2.8×10^{-10} mol/L.

After the purification step and as shown on Fig. 1a, the GNRs size is monodisperse with a length of 50 nm and a diameter of 14 nm (Fig. 1a). The CTAB cover the whole surface of the GNR. At some specific locations, the GNRs surface present less compact assemblies of CTAB. This occurs at any large angular change at the surface, especially at their extremities (Fig. 1b). Such observation has also been reported by Le Ru et al. on bipyramides. The authors have especially shown that the tip of the bipyramides are not covered by CTAB and are free to receive some analytes [22].

Proteins Coated-Gold Nanorods

Table 1 gives the detailed protein concentrations used for the LSPR shift measurements. The concentrations were not exactly identical; but it has no direct effect on the experiments since the proteins are in large excess compare to the GNRs. The protein concentrations were chosen largely higher than those of GNRs to be sure that all GNRs could capture proteins. All potential localizations where the proteins can be adsorbed at the GNRs surface are actually occupied (surface saturation) and it is then expected that the observed LSPR shift is the highest reachable with such GNRs and proteins. The final solutions were composed of 300 μL of proteins and 300 μL of GNRs, with a pH of 6 ± 0.5 (the measurement was made with pH paper).

Instrumentation

The GNRs have been characterized by scanning electron microscopy (Hitachi SU8000) and by extinction spectroscopy. The optical measurement has been made using a Jasco V-670 UV–Vis–NIR spectrometer in the range of 190–1,100 nm with a step of 1 nm. The experimentally obtained results were compared with finite-difference time-domain (FDTD) simulations using a commercially available FDTD solution software package from Lumerical Inc. [23].

Table 1 Molecular weight, isoelectric point, concentration, and plasmon resonance shift for each protein

Protein	Aprotinin	Lysosyme	Carbonic anhydrase	Ovalbumin	BSA	Conalbumin
Molecular weight/Da	6,500	14,600	29,000	43,000	66,430	75,000
Isoelectric point	10.5	11	6.55	4.7	4.8	6
Concentration/mol L ⁻¹	$1.5/10^{-5}$	$3/10^{-5}$	$3/10^{-5}$	$3/10^{-5}$	$6/10^{-5}$	$1.3/10^{-5}$
Shift (major axis)/nm	12	8	7	9	8	7
Shift (minor axis)/nm	7	0	5	0	3	4

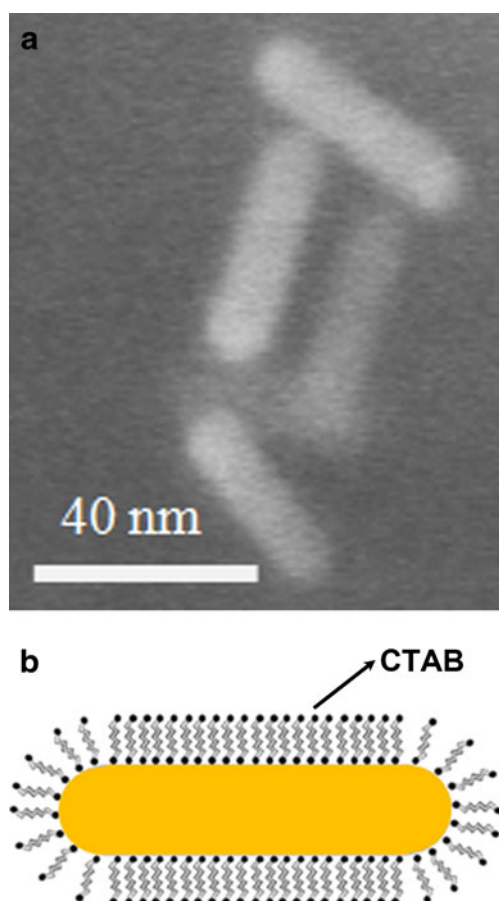


Fig. 1 **a** Representative scanning electron microscopy picture of synthesized GNRs in the presence of protein. **b** Illustrative scheme of CTAB-coated GNRs

The refractive indexes of the solutions were measured using an Abbe refractometer at interchangeable prism from Soplex. This apparatus gives a refractive index of a liquid from 1.3 to 1.7 with a precision of $2 \cdot 10^{-4}$ refractive index units. We respectively found $n=1.334$ for a concentration of conalbumin of $10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ and $n=1.335$ for a concentration of $10^{-4} \text{ molL}^{-1}$. Since the conalbumin is the heaviest protein used, we assume that the refractive index of all of the others protein solutions should not exceed 1.335. Moreover, ellipsometry measurement was performed on dry proteins and the highest refractive index found was close to 1.4 [24].

Results and Discussion

GNRs exhibit transversal and longitudinal LSPR that correspond to the electron oscillations perpendicular and parallel to the nanorod axis. Figure 2 presents the extinction spectra of GNRs alone in solution (solid line) and in the presence of two different proteins: carbonic anhydrase (dashed line) and ovalbumin (dotted line), respectively. Here, the synthesized GNRs with an average aspect ratio of 2.75 have a weak

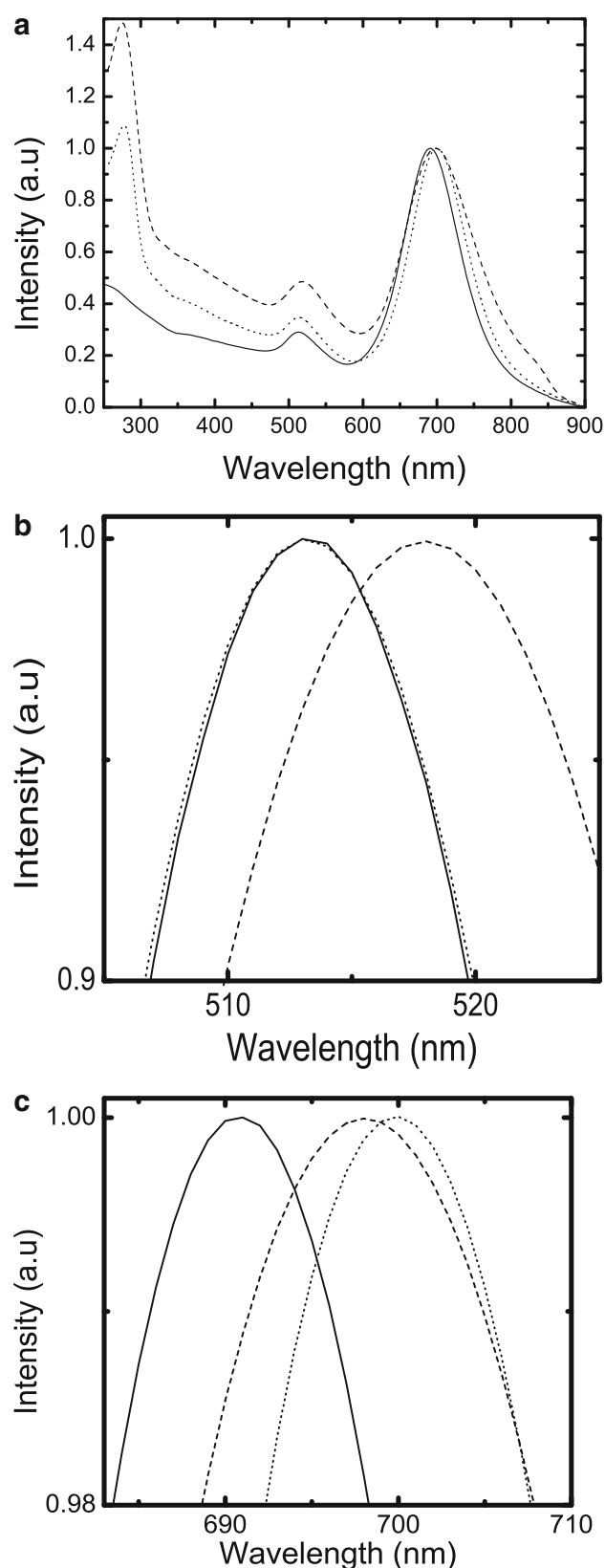


Fig. 2 **a** Extinction UV-vis near spectra of GNRs solution (solid line), carbonic anhydrase-coated GNRs (dash), and ovalbumin-coated GNRs (dots), respectively. **b** The normalized spectra of the transversal plasmon band. **c** The normalized spectra of the longitudinal plasmon band

transverse resonance band at 513 nm and a strong longitudinal plasmonic band at 691 nm. After mixing with protein solution the longitudinal plasmonic band redshifts by 7 and 9 nm in the presence of carbonic anhydrase and ovalbumin, respectively, while the transversal resonance band redshifts only in the case of carbonic anhydrase by 5 nm. This behavior indicates the adsorption of proteins onto the GNRs surface. This result is also confirmed by the presence of an absorbance band at about 285 nm in the spectrum of protein-coated GNRs (Fig. 2a) corresponding to protein adsorption. In conclusion, when protein solution is mixed with the GNRs, the longitudinal LSPR band and, in most of the cases, the transversal LSPR band are redshifted due to the change of the local dielectric environment, as a consequence of the protein deposition onto the GNRs surface.

The GNRs extinction spectrum is further used as reference to determine any LSPR shifts due to the different protein deposition. Table 1 summarized the LSPR shifts observed for all the proteins used in this study. One can notice that the LSPR shift for the LSP along the major axis is nearly constant whatever the protein molecular weight is (Fig. 3). An average shift of 8.5 nm is observed whereas the protein molecular weights vary from 6.5 up to 75 kDa. This shift does not depend on the type protein adsorbed at the GNRs surface and there is no correlation between the LSPR shift and the molecular weight of the protein. This observation is surprising since one could expect that the modification of the dielectric constant around the GNRs is all the more important that the protein weight is large.

Since the GNRs is positively charged whereas all proteins are negatively charged (the zeta potential is +26 mV for the GNRs and −42 mV for carbonic anhydrase or −26 mV for ovalbumin), there is an electrostatic attraction between the GNRs and the proteins. Thus, we assume that the LSPR shift is only due to the GNRs/protein interaction,

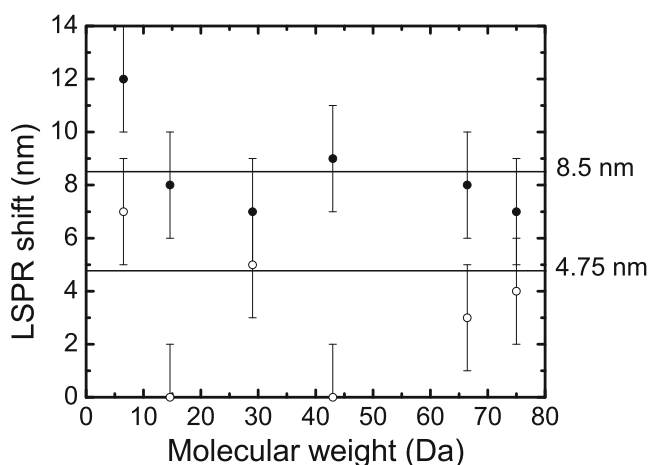


Fig. 3 Spectral shift of the LSPR as a function of the protein molecular weight (white point for transversal plasmon band and black point for longitudinal plasmon band)

and not to any GNRs/GNRs interactions (the GNRs repel each other). To confirm this observation, we can also notice that we do not observe the LSPR large shift (as large as several tens of nm) and the LSPR broadening occurring when the GNRs interact together in the near-field (GNRs distance lower than few tens of nanometer).

In order to explain the experimentally measured LSPR shifts, FDTD simulations were performed on a single CTAB-coated GNR and protein-capped GNR (Fig. 4a). The nanoparticle was treated as a semispherical end-capped cylinder with 44 nm length and 16 nm width according to the average size obtained from transmission electron microscopy measurements and the position of the plasmon resonances band. We considered a total-field/scattered-field

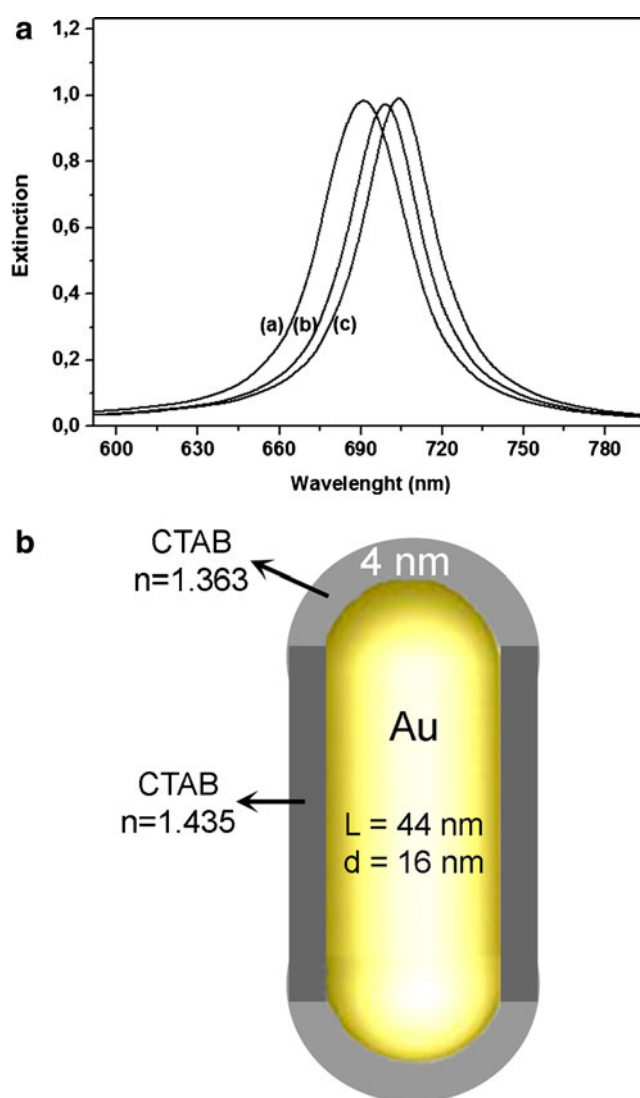


Fig. 4 **a** FDTD simulated longitudinal extinction spectra obtained for a single GNR of 44 nm length and 16 nm width coated with a 4 nm CTAB layer (spectrum a) and BSA-capped GNR, considering $n=1.37$ (spectrum b) and $n=1.4$ (spectrum c). **b** Schematic illustration of the GNR assumed in simulation

source with a wave vector k normal to the plan comprising the longitudinal axis of the nanorod and the incident electromagnetic field E_0 polarized either perpendicular to or along the longitudinal axis. The computation volume was divided into two different regions, one including both incident and scattered fields (total field) while the other including only the scattered field. The extinction spectra were calculated using a 0.6 nm grid size. The structure was placed in an aqueous surrounding media ($n=1.33$). The dielectric dispersion of gold was determined by best fitting the experimental data reported in literature (Johnson and Christy reported dielectric constant) [25]. Considering that the CTAB layer is more densely packed on the lateral facets of GNR compared to its ends, the coating CTAB shell was modeled as a 4 nm layer with a refractive index of 1.435 wrapped around the cylinder [26] while for less densely packed layer from the ends an effective refractive index of 1.363 obtained for a combination of 30 % CTAB and 70 % water was considered (Fig. 4b). Subsequently, in order to simulate the protein adsorption at the semispherical ends of GNR, we have chosen the particular case of BSA, an ellipsoidal protein with the major axis of 14 nm and the minor axis of 4 nm having a refractive index of 1.445. In the first approximation, the BSA layer covering the GNR ends was modeled as a 14 nm semispherical shell with a refractive index of 1.4, considering the case of 80 % coverage. Taking into consideration that the maximum surface area per GNR available for the absorption of BSA molecules is 803 nm² (calculated as the total surface of the two semispherical caps in the absence of CTAB molecules) and the average area occupied by a single ellipsoidal BSA molecule on the basis of its size is 12.6 nm² [27], 63 BSA molecules deposited at the semispherical ends of one GNR for a surface coverage of 100 % was calculated. The simulated spectrum obtained for 80 % coverage is redshifted by 13 nm compared to the spectrum obtained for the CTAB-coated GNR, which means that experimentally, the concentration of BSA molecules at the surface of the GNR ends is actually lower than the assumed situation (see Fig. 2c). In this context, with the aim to reproduce the LSPR result, the refractive index of the covering layer was reduced to 1.37 case in which we assume that GNR ends surface is only 40 % covered with protein. The resulting redshift of 8 nm is in good agreement with the experimentally obtained value. This result suggests the presence of about 25 BSA proteins at the extremities of the GNRs, demonstrating the formation of a partial layer at the GNRs surface.

Moreover, the same LSPR shift is observed for all the proteins, meaning that the local modification of the refractive index is always the same. In Fig. 3, a nearly constant redshift of the minor axis LSPR is observed for all the proteins except lysozyme and ovalbumin for which the shift is null (we will come back on this effect latter). We explain

this observation as follow: as mentioned before, the GNRs are covered by CTAB except at their extremities (Fig. 1). The CTAB layer should block the protein deposition along the major axis and they should only adsorb at the GNRs extremities. In this case, the coverage would be exactly the same whatever the protein since the free space is constant for all GNRs. For a larger protein, a lower number of proteins will adsorb leading then to a nearly constant LSPR shift.

This latter observation gives us some interesting information on the sensing capacities of the GNRs. For saturated GNRs, a shift of only 8 nm can be observed which is very low. If we assume that only 40 BSA proteins (20 for each extremity) can effectively be adsorbed at the GNRs extremities, we get such redshift for a BSA concentration around 10⁻⁸ mol/L (corresponding to 40 BSA molecules per GNR multiply by the GNRs concentration known to be 2.8 × 10⁻¹⁰ mol/L). If we suppose that we could observe some redshift of 0.1 nm, it means that limit of detection will be around 10⁻¹⁰ M with a sensitivity of 10⁻⁹ mol/L/nm. All these values should be modulated depending on the proteins weight (lower is the protein weight lower is the detection limit but lower is the sensitivity). Thus, the detection range is very thin (between 10⁻¹⁰ and 10⁻⁸ mol/L) and it seems to be difficult to get some dependence with the weight on the proteins. These observations indicate also that the use of GNRs as biosensor could only be used to detect the presence of proteins in a solution (qualitative information) but could not give any quantitative information on the protein weight or concentration (determination of a precise concentration and identification of the proteins).

Another interesting result is given by the observation of the minor axis shift for lysozyme and ovalbumin. As mentioned previously, the LSPR shift in the minor axis direction is null. On these specific cases, since there is a LSPR shift only for the major axis, the presence of protein affects only the LSPR in one direction and not the other one. We interpret this result as a supplementary proof that the protein attached only on the ends of the GNRs. It also means that any change of the local refractive index in one specific GNR direction will only affect one LSPR position and not both (only the major axis LSPR in our case). Local refractive index change could then not be considered in an equivalent effective refractive index since in this case, both LSPR should have been redshifted.

Conclusion

In this paper, we have discussed the consequences of the protein absorption on the LSPR of GNRs. We found that a LSPR shift is constant whatever the protein used and does not depend on their molecular weight. We then conclude

that the use of GNRs in biosensing system could only give qualitative information on the presence of proteins in solution but not quantitative information on their characteristics (size, weight, etc.). We demonstrate that the proteins are adsorbed only at the GNRs extremities. We also show that in some specific cases, only the major axis LSPR is red-shifted whereas the minor axis LSPR is not modified.

Acknowledgments This work was supported by the Programme Hubert Curien Brancusi, by the ANCS, project number PN II Capacitati/Brancusi, 489/2011 and by the Nanoantenna European project (FP7-HEALTH-F5-2009 241818).

References

1. Anker JN, Hall WP, Lyandres O, Shah NC, Zhao J, Van Duyne RP (2008) Biosensing with plasmonic nanosensors. *Nat Mater* 7:442–453
2. Barbillon G, Bijeon J-L, Plain J, de la Chapelle ML, Adam P-M, Royer P (2007) Biological and chemical gold nanosensors based on localized surface plasmon resonance. *Gold Bull* 40:240–244
3. Link S, Mohamed MB, El-Sayed MA (1999) Simulation of the optical absorption spectra of gold nanorods as a function of their aspect ratio and the effect of the medium dielectric constant. *J Phys Chem B* 103:3073–3077
4. Mock JJ, Smith DR, Schultz S (2003) Local refractive index dependence of plasmon resonance spectra from individual nanoparticles. *Nano Lett* 3:485–491
5. Chen H, Kou X, Yang Z, Ni W, Wang J (2008) Shape and size dependent refractive index sensitivity of gold nanoparticles. *Langmuir* 24:5233–5237
6. Haes AJ, Zou S, Schatz GC, Van Duyne RP (2004) A nanoscale optical biosensor: the long range distance dependence of the localized surface plasmon resonance of noble metal nanoparticles. *J Phys Chem B* 108:109–116
7. Haes A, Van Duyne RP (2004) A unified view of propagating and localized surface plasmon resonance biosensors. *Anal Bioanal Chem* 379:920–930
8. Whitney AV, Elam JW, Zou S, Zinovev AV, Stair PC, Schatz GC, Van Duyne RP (2005) Localized surface plasmon resonance nanosensor: a high-resolution distance-dependence study using atomic layer deposition. *J Phys Chem B* 109:20522–20528
9. Grand J, Adam P-M, Grimault A-S, Vial A, Lamy de la Chapelle M, Bijeon J-L, Kostcheev S, Royer P (2006) *Plasmonics* 1:135–139
10. Link S, El-Sayed MA (1999) Spectral properties and relaxation dynamics of surface plasmon electronic oscillations in gold and silver nanodots and nanorods. *J Phys Chem B* 103:8410–8426
11. Gabudean AM, Biro D, Astilean S (2011) Localized surface plasmon resonance (LSPR) and surface enhanced Raman scattering (SERS) studies of 4-aminothiophenol adsorption on gold nanorods. *J Mol Struct* 993:420–424
12. Law W-C, Yong K-T, Baev A, Hu R, Prasad PN (2009) Nanoparticle enhanced surface plasmon resonance biosensing: application of gold nanorods. *Opt Express* 17:19041–19046
13. Chen C-D, Cheng S-F, Chau L-K, Wang CRC (2007) Sensing capability of the localized surface plasmon resonance of gold nanorods. *Biosens Bioelectron* 22:926–932
14. Huang H, He C, Zeng Y, Xia X, Yu X, Yi P, Chen Z (2009) A novel label-free multi-throughput optical biosensor based on localized surface plasmon resonance. *Biosens Bioelectron* 24:2255–2259
15. Parab HJ, Jung C, Lee J-H, Park HG (2010) A gold nanorod-based optical DNA biosensor for the diagnosis of pathogens. *Biosens Bioelectron* 26:667–673
16. Barbillon G, Bijeon J-L, Plain J, de la Chapelle ML, Adam P-M, Royer P (2007) Electron beam lithography designed chemical nanosensors based on localized surface plasmon resonance. *Surf Sci* 601:5057–5061
17. Barbillon G, Bijeon J-L, Bouillard J-S, Plain J, Lamy de la Chapelle M, Adam P-M, Royer P (2008) *J Microsc* 229:385–389
18. Toderas F, Iosin M, Astilean S (2009) Luminescence properties of gold nanorods. *Nucl Inst Methods Phys Res B Beam Interact Mater Atoms* 267:400–402
19. Yu C, Irudayaraj J (2007) Multiplex biosensor using gold nanorods. *Anal Chem* 79:572–579
20. Iosin M, Toderas F, Baldeck PL, Astilean S (2009) Study of protein–gold nanoparticle conjugates by fluorescence and surface-enhanced Raman scattering. *J Mol Struct* 924–926:196–200
21. Orendorff CJ, Murphy CJ (2006) Quantitation of metal content in the silver-assisted growth of gold nanorods. *J Phys Chem B* 110:3990–3994
22. Le Ru EC, Grand J, Sow I, Somerville WRC, Etchegoin PG, Treguer-Delapierre M, Charron G, Féridj N, Lévi G, Aubard J (2011) *Nano Lett* 11:5013–5019
23. <http://www.lumerical.com/fdtd.php>
24. Barchiesi D, Lidgi-Guigui N, de la Chapelle ML (2012) Functionalization layer influence on the sensitivity of surface plasmon resonance (SPR) biosensor. *Opt Commun* 285:1619–1623
25. Johnson PB, Christy RW (1972) Optical constants of the noble metals. *Phys Rev B* 6:4370–4379
26. Yu C, Varghehse L, Irudayaraj J (2007) Surface modification of cetyltrimethylammonium bromide-capped gold nanorods to make molecular probes. *Langmuir* 23:9114–9119
27. Carter DC, He XM, Munson SH, Twigg PD, Gernert KM, Broom MB, Miller TY (1989) Three-dimensional structure of human serum albumin. *Science* 244:1195–1198

Article 2

Study of gold nanorods–protein interaction by localized surface plasmon resonance spectroscopy

Néné Thioune, Nathalie Lidgi-Guigui, **Maximilien Cottat**, Ana-Maria Gabudean, Monica Focsan, Henri-Michel Benoist, Simion Astilean, Marc Lamy de la Chapelle

Gold Bulletin, 46:275-281 (2013)

Study of gold nanorods–protein interaction by localized surface plasmon resonance spectroscopy

Néné Thioune · Nathalie Lidgi-Guigui · Maximilien Cottat ·
Ana-Maria Gabudean · Monica Focsan · Henri-Michel Benoist ·
Simion Astilean · Marc Lamy de la Chapelle

Published online: 2 November 2013

© The Author(s) 2013. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract In this paper, gold nanorods' (GNRs) interaction with different proteins (i.e. carbonic anhydrase, lysozyme, ovalbumin and bovine serum albumin (BSA)) at physiological pH is investigated using localized surface plasmon resonance (LSPR) spectroscopy. We observe that the incubation of these proteins at different concentrations with cetyltrimethylammonium bromide-capped GNRs of three aspect ratios induces dramatic changes in the extinction spectra of the nanoparticles. In particular, we correlate the position and shape of the longitudinal LSPR peaks to the ability of the proteins to specifically interact with GNRs' surface. The different types of behaviour observed are explained by the exposed molecular surface area of the proteins' cysteine residues as modelled on the basis of their respective X-ray crystallographic data structures. Cysteine is the only amino acid that exhibits an SH group that is well known to have a strong affinity to gold. The presence and the accessibility of such a residue may explain the protein binding to GNRs. The isoelectric point of the proteins is also an important characteristic to take into account, as the electrostatic strength between GNRs and protein explains some of the cases where aggregates are formed.

Keywords Proteins · LSPR · Gold nanorods (GNRs) · isoelectric point · Solvant accessible area

Introduction

During the last decades when nanosciences have made their revolution, gold nanoparticles (GNPs) have attracted particular interests for many reasons. Among them, two have drawn our attention in the present study. First, their genuine optical properties make them of prime choice for many applications especially in medicine and biology [1, 2]. Second, they are highly stable in many liquid or gaseous environments, which makes them very versatile. GNPs provide high contrast in cellular and tissue imaging using confocal reflectance microscopy [3] or dark-field imaging [4]. They have been used in photothermal therapy of cancer [5]. Their optical relevance is mainly due to the localized surface plasmon resonance (LSPR) emerging in the visible spectral range for GNPs with size between ~2 to ~200 nm. Moreover, LSPR can be finely tuned by changing the GNPs size, environment or shape. The literature is rich in articles describing protocols to synthesize a wide range of GNPs of different shapes and geometries such as spherical particles, nanorods, nanoshells, nanostars and nanocages [6, 7]. Interestingly, a non-spherical nanoparticle will present several resonance characteristics of its shape [8, 9]. Gold nanorods (GNRs) are in this aspect, highly studied because their LSPR can be tuned on a wider wavelength scale. The aspect ratio of GNRs is also easily deduced from their absorption spectra. The LSPR sensitivity to the nanoparticle close environment makes GNPs good candidates for sensor use.

GNRs are more and more often used in biology and for biomedical applications. Reports are found on their use in biosensing, bio-imaging, photothermal therapy or even in theranostic [10–13]. The common point of all these works is

N. Thioune · N. Lidgi-Guigui (✉) · M. Cottat · M. L. de la Chapelle
Laboratoire CSPBAT UMR CNRS 7244 UFR SMBH, Université
Paris 13, Sorbonne Paris Cité, 74 rue Marcel Cachin, 93017 Bobigny,
France
e-mail: nathalie.lidgi-guigui@univ-paris13.fr

A.-M. Gabudean · M. Focsan · S. Astilean
Nanobiophotonics and Laser Microspectroscopy Center,
Interdisciplinary Research Institute on Bio-Nano-Sciences,
Faculty of Physics, Babes-Bolyai University, T. Laurian 42,
400271 Cluj-Napoca, Romania

N. Thioune · H.-M. Benoist
Département d'Odontologie de Dakar, Université Cheikh Anta Diop
(UCAD) BP 5005, Dakar, Senegal

the necessity to attach the appropriate biomolecules to the GNRs, in order for it to accomplish the task it was designed for. For this, several routs can be considered, namely ligand exchange, electrostatic interaction, biofunctional linkage and surface coating. All these techniques are described in detail in [14, 15]. Giving the increasing interest of scientist from all disciplines for working with these tremendous nanostructures in a bio-environment, it is of crucial importance to understand how they directly interact with biomolecules.

In the present study, cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)-capped GNRs were synthesized using the seed-mediated growth method in order to study their direct interaction with four different proteins (i.e. carbonic anhydrase, lysozyme, ovalbumin and bovine serum albumin (BSA)). GNRs represent a unique class of metallic nanostructures with two well-defined LSPR bands in the visible/near infrared spectral range corresponding to electronic oscillations along the short and long axis of nanorods. In a previous work [16], we already showed that the position of these two LSPR bands is not dependent on the molecular weight of the proteins interacting with the GNRs surface. In this context, we are interested in investigating the interaction of the above mentioned proteins at physiological pH with GNRs as function of their concentrations using LSPR spectroscopy.

Experimental

Reagents

Tetrachloroauric(III) acid (HAuCl_4), CTAB and ascorbic acid were purchased from Aldrich. Sodium borohydride (NaBH_4 , 99 %) and silver nitrate (AgNO_3) were obtained from Merck. Lysozyme from chicken egg white (ref. 62970), carbonic anhydrase from bovine erythrocytes (86.5 %, ref. c3934) and albumin from bovine serum (BSA ref. a8806, 96 %) were purchased from Sigma-Aldrich. Ovalbumin (ref. W377206) has been provided by GE Healthcare. All proteins were dissolved in distilled water at concentrations ranging from 10^{-10} to 10^{-4} M. Table 1 gives the main characteristics of the proteins used.

Table 1 Proteins characteristics

Protein	Molecular weight (kDa)	Isoelectric point (IEP)	pH	Number of accessible sulphur
BSA	66.5	4.7	7 ± 0.5	2
Ovalbumin	43	4.6	7 ± 0.5	1
Carbonic anhydrase	29	5.9	7 ± 0.5	0
Lysozyme	14.6	11.35	7 ± 0.5	1

Synthesis of GNRs

GNRs were synthesized utilizing the seed-mediated growth method described in details in [16]. The UV–visible spectra of each set of GNRs are presented on Fig. 1. The shift of the spectra is explained by the fact that the three solutions contain GNRs with different aspect ratios.

Preparation of proteins/GNRs conjugates

All protein solutions were prepared in distilled water at $\text{pH} = 7 \pm 0.5$. Six concentrations of protein solutions were prepared (100 pM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μM , 10 μM and 100 μM) except for BSA for which just 1 nM, 100 nM and 10 μM solutions were prepared. Then, 250 μl of pure GNR solutions were mixed with 400 μl of the protein solution at different concentration values. The samples were incubated at room temperature for 20 min before the measurement.

Instrumentation

The interaction between CTAB-capped GNRs and the different proteins was characterized by extinction spectroscopy. Spectra were recorded using a Kontron Uvikon 941 spectrophotometer in the range of 400 to 800 nm with 1 nm step and 1 nm resolution. The extinction spectra were fitted using the “multipeak fit” tool on Origin[®] with a Lorentzian type.

The GNRs morphology was analysed with conventional transmission electron microscopy (TEM) using a JEOL 100 U type TEM microscope operated at 100 kV accelerating voltage. The ζ potential of the colloidal solutions was measured using a particle analyser (Nano ZS90 Zetasizer, Malvern Instruments) equipped with a He–Ne laser (633 nm, 5 mW) and a measurement angle of 90° . Each sample was measured three times, and the mean value was reported.

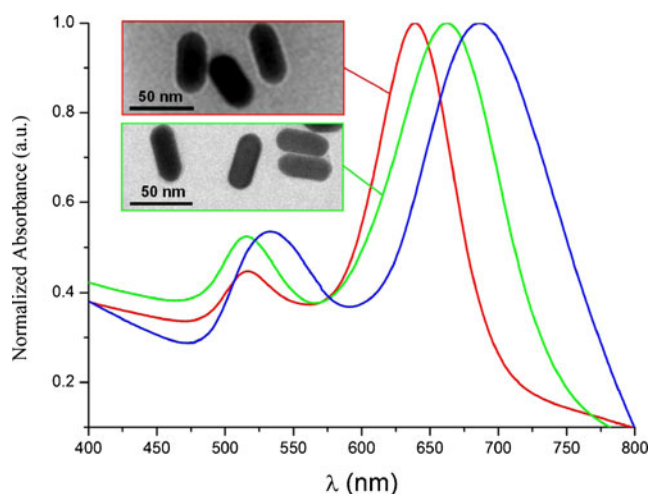


Fig. 1 Normalized LSPR spectra of the three types of synthesized GNRs

The solvent molecular surface area (MSA) of the proteins was estimated using a solvent probe of 1.4 Å; numerical results were obtained using GetArea [17] and graphically confirmed using Jmol (<http://jmol.sourceforge.net>).

Results

Figure 1 illustrates the normalized extinction spectra of the as-synthesized GNRs. The spectral position of transversal LSPR band and the longitudinal LSPR bands at 639, 662 and 686 nm correspond to GNRs with aspect ratios of 2.1 (average length/width, 46/22), 2.52 (average length/width, 43/17 nm) and 2.8 (average length/width, 42/15 nm), respectively, as given by TEM images (see inset in Fig. 1). In the following, data will be presented showing the interaction of proteins with one set of the GNR. All the experiences were repeated at least once with another set of GNR, and the results were reproducible. Herein, we will mainly focus on the study of the longitudinal LSPR (i.e. width and position) to explain the mechanism of GNRs/proteins interaction.

Figure 2 presents the modifications of the longitudinal LSPR peak of GNRs in the presence of different concentrations

of proteins. Upon incubation of GNRs with carbonic anhydrase (Fig. 2a) and lysozyme (Fig. 2b) protein solutions, the positions of the longitudinal LSPR peaks vary as function of protein concentration. Moreover, we observe that the width of the bands is constant, indicating a good dispersion of the nanoparticles in the solution. On the opposite, dramatic changes of the longitudinal LSPR bands were observed after incubation of the colloidal solution with ovalbumin (Fig. 2c) and BSA (Fig. 2d) solutions. In the case of ovalbumin (Fig. 2c), the protein seems to interact with GNRs' surface in the same manner as carbonic anhydrase or lysozyme except at 100 nM and 1 μ M. At these concentrations, the intensity of plasmonic band suddenly decreases together with its broadening, clearly suggesting the aggregation of nanoparticles. Similarly, this phenomenon was also induced by BSA protein at the concentrations of 1 and 100 nM (Fig. 2d). Taking into account that the spectral position of the LSPR band is strongly dependent on the dielectric function of GNRs' local environment, the modification of its position together with its broadening indicate the extent of individual or aggregated nanoparticles in colloidal solution.

In order to study these spectral modifications, we have fitted the longitudinal LSP band with Lorentzian curves. As

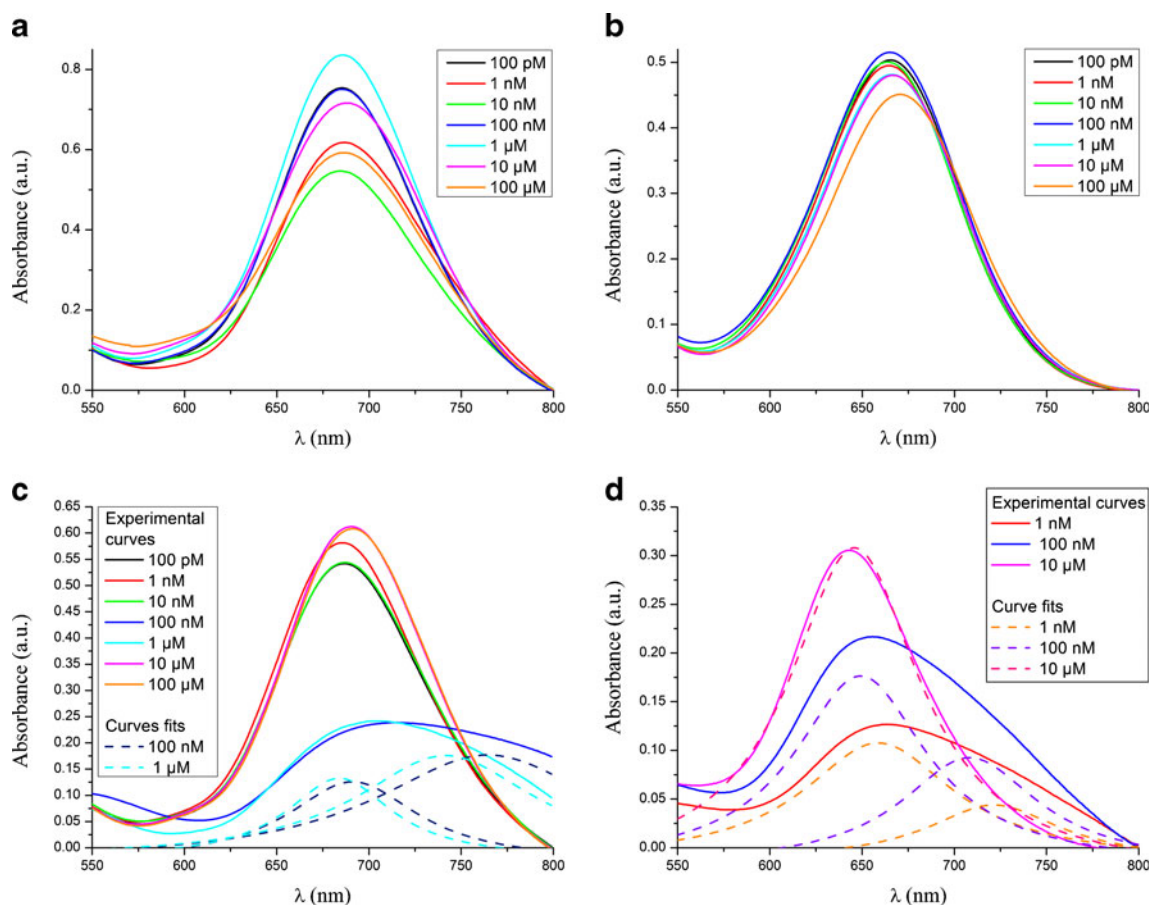


Fig. 2 Longitudinal LSPR band of synthesized GNRs in the absence and presence of: **a** carbonic anhydrase, **b** lysozyme, **c** ovalbumin and **d** BSA of different concentrations

it reveals on Fig. 2c, d, the widest LSP were fitted with two Lorentzian when only one was needed for the unaltered LSP. The experimental recorded curve reflects a composite plasmonic resonances of (1) GNRs interacting with the protein as mentioned above (individual mode) and (2) protein-induced aggregation of GNRs (aggregation mode).

To understand the mechanism underlying these two modes, Fig. 3 was plotted. For this, the shift between the highest LSPR (aggregation mode if it exists, otherwise the normal mode) and the pure GNRs is measured and then plotted. Giving the resolution of the spectrometer, there is no observable shift for carbonic anhydrase. On the opposite, the GNRs' individual mode in presence of lysozyme and ovalbumin proteins, respectively, displays a red shift for a high enough concentration (~ 10 nM), indicating an increase of the dielectric constant of the GNRs surrounding medium. In other words, a material

with higher dielectric constant than CTAB has replaced or at least attached to the surfactant molecules. Obviously, this material can only be the proteins.

The extent of this red shift varies in a specific way. It is constant or slightly decreases as the protein concentrations increase until it reaches a minimum value at 10 nM for lysozyme and 1 nM for ovalbumin. For higher concentration, the extent of the shift increases again. We believe that this behaviour highlights some aspect of the GNRs/protein interactions as it is discussed in the next section.

Discussion

We explain the behaviour of the proteins toward GNRs by exploiting the available data on their electric charges and structures. The electric charge of the proteins at the working pH was obtained from their isoelectric point (Table 1). The electrostatic interaction between proteins and GNRs was studied, taking into account that the GNRs are capped with CTAB, which makes them positively charged (the ζ potential was measured to be +20 mV).

The structure of the proteins was gathered from the RCSB Protein Data Bank[®]. The structure of the proteins studied here was obtained from X-ray crystallographic data [18–21]. The cysteine (Cys) residue is the centre of our interest since it is the only amino acid which owns a thiol group. In chemistry, thiols are compounds which are very famous to demonstrate strong affinity to gold. In the presence of thiols, strong sulphur–gold bonds are formed, which are renowned to be strong covalent bonds. Previous studies [22, 23] on GNPs/protein interactions have shown that the binding of protein to a very small GNP depends firstly on the existence of a Cys inside the protein and secondly, on the accessibility of the thiol group of the Cys residue. Herein, the sulphur accessibility is estimated via the notion of MSA [24]. This is defined as the contact surface area of a solvent probe sphere that rolls along the surface of the protein. Using the software GetArea, we have calculated for each Cys residue, its MSA and the surface energy of the corresponding sulphur. The idea here is to measure the availability of the sulphur to bind to the GNRs. The same approach was followed using Jmol. Figure 4 shows the MSA (red dots) for a 1.4-Å sphere rolled on the protein surface.

In particular, carbonic anhydrase has only one Cys residue which is located inside its volume, making the sulphur non-accessible for binding with GNRs. Thus, the only existing interaction between carbonic anhydrase and GNRs is through electrostatic forces. As the carbonic anhydrase is negatively charged at the working pH of 7, it can only bind to positively charged structures, here, the CTAB-capped GNRs. We suppose that carbonic anhydrase can only weakly adsorb on the CTAB double layer and not on the GNRs' surface. This explains that no shift is observed for carbonic anhydrase on

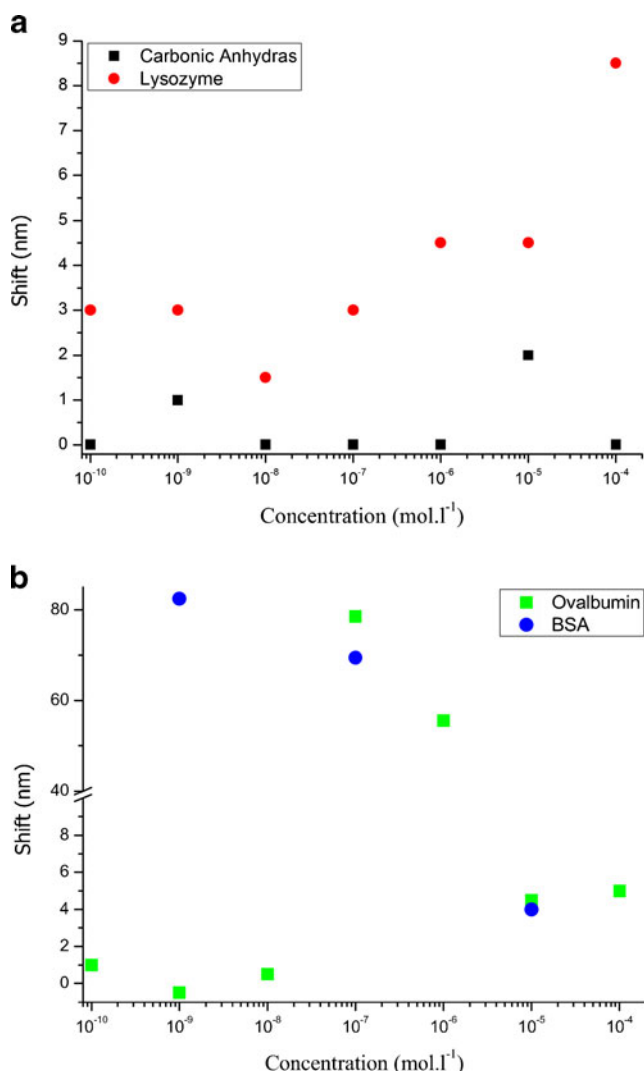


Fig. 3 Longitudinal LSPR peak shift versus protein concentration. The longitudinal LSPR shift is calculated by comparing the position of the LSPR band of pure GNRs solution with the position of the corresponding band of conjugates

Fig. 4 CPK view of **a** carbonic anhydrase, **b** lysozyme, **c** ovalbumin and **d** BSA. The *red dots* materialized the MSA; the Cys residues are coloured in *green* and the sulphur atoms in *yellow*

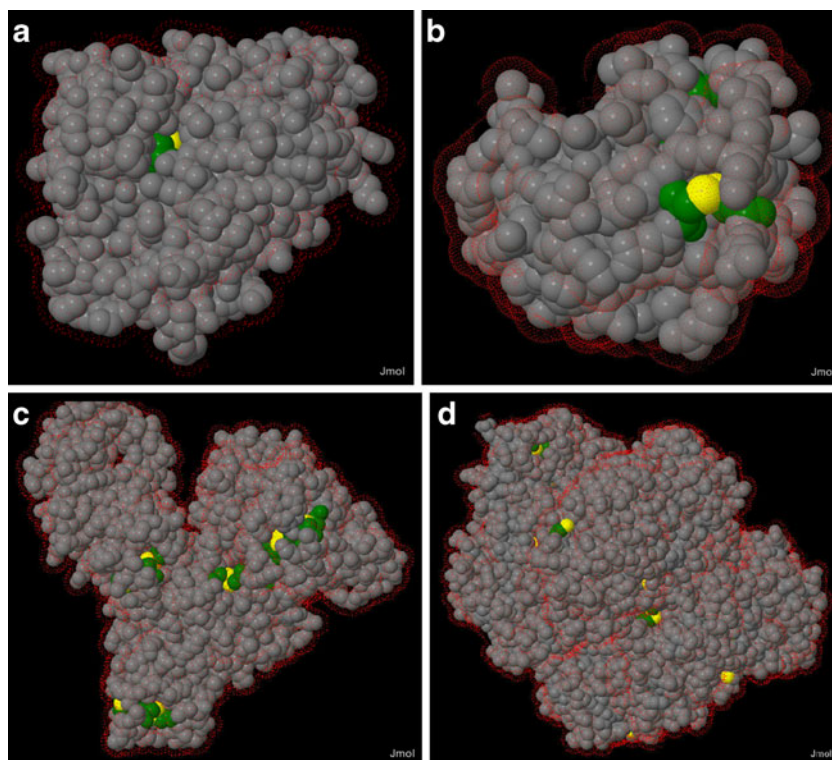


Fig. 3a: the GNRs environment does not change and so its longitudinal LSPR. However, small deviations can occur, that are probably due to the imperfection of the CTAB capping. Especially, it is known that the CTAB double layer is sparse at the GNRs extremities.

As mentioned above, in the case of lysozyme and ovalbumin, the behaviour of individual mode is quite different. For both proteins, a red shift is observed for all the concentrations. If the proteins were just electrostatically adsorbed to the CTAB double layer, we would observe no shift just as for carbonic anhydrase. Thus, we can conclude that lysozyme and ovalbumin replace CTAB. We also observe for both proteins that the red shift extent first decreases until a specific concentration before it increases again. The CTAB bilayer surrounding the GNRs is most probably in competition with the protein. As shown in Table 2 and Fig. 4, lysozyme and ovalbumin have one accessible thiol. It is known that the functionalization of CTAB-capped GNR with thiolated molecules is trivially made by the sulphur–gold interaction that overcomes the weak binding of CTAB to gold [14]. The consequence of the addition of lysozyme (respectively ovalbumin) is the binding of the protein to gold GNR and the removal of CTAB. We observe here that a minimum value of the concentration has to be reached before proteins replace most of the CTAB (when the red shift extent increases).

If the first part of the LSPR, shift is similar for lysozyme and ovalbumin; the latter shows two main specificities. First of all, in the case of ovalbumin, the lowest red shift of the LSPR band

occurs for a lower concentration than for lysozyme. Contrary to lysozyme, ovalbumin is negatively charged in the experimental conditions (see Table 1). As the GNRs are strongly positively charged, the electrostatic attraction forces are added to the thiol attraction. The result is an easier attachment of the proteins to the GNRs.

The second point to rise is the aggregation taking place at 100 nM and 1 μ M (Fig. 3b). Once again, we explain this behaviour by the surface charge of ovalbumin. Electrostatic attraction forces act on several GNRs at the same time allowing the formation of aggregates. This is why the ovalbumin/GNRs ratio has to be very well controlled to avoid charge neutralization and hence aggregation. Many studies have already shown that a stabilized attachment of proteins

Table 2 Summary of the cysteine (Cys) residues properties in carbonic anhydrase, lysozyme, ovalbumin, BSA and IgG

Protein	Number of Cys residues	Number of Cys residues with MSA >20 Å	Number of SH groups with surface energy >15 mcal mol ⁻¹
Carbonic anhydrase	1	0	0
Lysozyme	8	1	1
Ovalbumin	23	1	1
BSA	35	5	2
IgG	34	5	2

to GNPs thanks to electrostatic interaction required an optimization of both the pH and the concentration of the solutions [14, 25, 26].

The case of BSA has in common with ovalbumin that it is negatively charged at pH 7 and thus is electrostatically attracted to the CTAB-capped GNPs. Nevertheless, BSA has also the characteristic of containing quite a lot of Cys residues (see Table 2). Among them, only five are solvent accessible, and among these five, two sulphur have enough surface energy to bind to gold surface. Not only BSA has twice more accessible sulphur than lysozyme or ovalbumin but these two sulphurs (in Cys 200 and Cys 559) are located on opposite sides of the protein (Fig. 4d). This way, one BSA can bind to two different GNPs. This is how very strong aggregates are formed.

The longitudinal LSPR is becoming closer to the same band of pure GNPs as the BSA concentration increases. The origin of this can be the fact that a strong excess of BSA in the presence of CTAB is known to form aggregates of proteins [27]. The concentration of BSA actually interacting with GNPs is thus much lower than the nominal concentration. Instead of increasing, the number of BSA interacting with the GNPs is decreasing, explaining the reduction of the longitudinal LSPR shift.

Conclusion

In this article, we have investigated the interaction of GNPs with carbonic anhydrase, lysozyme, ovalbumin, and BSA regarding the proteins concentration using LSPR spectroscopy. In a previous study [16], we have already demonstrated that the longitudinal LSPR shift is the most significant for the understanding of GNPs/protein interaction. In the same reference, we established the fact that the molecular weight of the proteins is not a relevant parameter to characterize this interaction. In the present letter, we have considered the protein concentration, isoelectric point and the MSA to explain the experimental results. The conclusion is that the number of accessible sulphurs is of crucial importance to explain the shape of the longitudinal LSPR shift evolution with the concentration. If there are too many, like in the case of BSA, strong aggregates are formed. If there is only one, the evolution of the longitudinal LSPR with the concentration presents two parts: the first one decreases and the second one increases. Then, the isoelectric point gives insight of the electric charge of the protein and explains some of the GNPs/proteins aggregation cases. Carbonic anhydrase which has no accessible sulphur and is negatively charged barely binds to GNPs. In comparison, ovalbumin has one accessible sulphur and is negatively charged; it binds to GNPs and in some conditions can even form electrostatic aggregates.

Liu et al. [28] conducted a similar study in 2012 using dynamic light scattering (DLS) instead of extinction spectroscopy. They come to the same conclusion as us, concerning the interaction between GNPs and BSA or human serum albumin, and they show that immunoglobulin (IgG and IgA) follow the same behaviour as ovalbumin. However, they fail to explain the difference of behaviour between these proteins. When looking at the available sulphur in IgG or IgA (Table 2) [29], we found that the three of them are in the same location (bottom of Fab and top of Fc). Steric interaction most probably cancels the duplicity of thiols, so they behave as there was only one accessible sulphur. This is in complete agreement with the explanation developed in our study.

Acknowledgments This work was supported by the Programme Hubert Curien Brancusi, by the ANCS, project number PN II Capacitati/Brancusi, 489/2011 and by the Nanoantenna European project (FP7-HEALTH-F5-2009 241818)

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License which permits any use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and the source are credited.

References

1. El-Sayed IH, Huang X, El-Sayed M (2005) Surface plasmon resonance scattering and absorption of anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles in cancer diagnostics: applications in oral cancer. *Nano letters* 5:829–834. doi:10.1021/nl050074e
2. Aslan K, Lakowicz JR, Geddes CD (2005) Plasmon light scattering in biology and medicine: new sensing approaches, visions and perspectives. *Current opinion in chemical biology* 9:538–544. doi:10.1016/j.cbpa.2005.08.021
3. Aaron J, Nitin N, Travis K et al (2007) Plasmon resonance coupling of metal nanoparticles for molecular imaging of carcinogenesis in vivo. *Journal of biomedical optics* 12:034007. doi:10.1117/1.2737351
4. Liu GL, Yin Y, Kunchakarra S et al (2006) A nanoplasmonic molecular ruler for measuring nuclease activity and DNA footprinting. *Nature nanotechnology* 1:47–52. doi:10.1038/nnano.2006.51
5. Li W, Cai X, Kim C et al (2011) Gold nanocages covered with thermally-responsive polymers for controlled release by high-intensity focused ultrasound. *Nanoscale* 3:1724–1730. doi:10.1039/c0nr00932f
6. Chen J, Saeki F, Wiley BJ et al (2005) Gold nanocages: bioconjugation and their potential use as optical imaging contrast agents. *Nano letters* 5:473–477. doi:10.1021/nl047950t
7. Geddes CD (ed) (2012) *Reviews in Plasmonics 2010*. Springer, New York. doi:10.1007/978-1-4614-0884-0
8. Hu M, Chen J, Li Z-Y et al (2006) Gold nanostructures: engineering their plasmonic properties for biomedical applications. *Chemical Society reviews* 35:1084–1094. doi:10.1039/b517615h
9. Sun Y, Xia Y (2003) Gold and silver nanoparticles: a class of chromophores with colors tunable in the range from 400 to 750 nm. *Analyst* 128:686. doi:10.1039/b212437h

10. Chen C-D, Cheng S-F, Chau L-K, Wang CRC (2007) Sensing capability of the localized surface plasmon resonance of gold nanorods. *Biosensors & bioelectronics* 22:926–932. doi:[10.1016/j.bios.2006.03.021](https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.03.021)
11. Yong K-T, Swihart MT, Ding H, Prasad PN (2009) Preparation of gold nanoparticles and their applications in anisotropic nanoparticle synthesis and bioimaging. *Plasmonics* 4:79–93. doi:[10.1007/s11468-009-9078-2](https://doi.org/10.1007/s11468-009-9078-2)
12. Huang X, El-Sayed IH, Qian W, El-Sayed MA (2006) Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods. *Journal of the American Chemical Society* 128:2115–2120. doi:[10.1021/ja057254a](https://doi.org/10.1021/ja057254a)
13. Young JK, Figueroa ER, Drezek RA (2012) Tunable nanostructures as photothermal theranostic agents. *Annals of biomedical engineering* 40:438–459. doi:[10.1007/s10439-011-0472-5](https://doi.org/10.1007/s10439-011-0472-5)
14. Huang X, Neretina S, El-Sayed MA (2009) Gold nanorods: from synthesis and properties to biological and biomedical applications. *Adv Mater* 21:4880–4910. doi:[10.1002/adma.200802789](https://doi.org/10.1002/adma.200802789)
15. Joshi PP, Yoon SJ, Hardin WG et al (2013) Conjugation of antibodies to gold nanorods through Fc. *Synthesis and Molecular Specific Imaging. Bioconjugate chemistry, Portion.* doi:[10.1021/bc3004815](https://doi.org/10.1021/bc3004815)
16. Cottat M, Thioune N, Gabudean A-M et al (2012) Localized surface plasmon resonance (lsp) biosensor for the protein detection. *Plasmonics* 8:699–704. doi:[10.1007/s11468-012-9460-3](https://doi.org/10.1007/s11468-012-9460-3)
17. Fraczekiewicz R, Braun W (1998) Exact and efficient analytical calculation of the accessible surface areas and their gradients for macromolecules. *J Comput Chem* 19(3):319–333
18. Diamond R (1974) Real-space refinement of the structure of hen egg-white lysozyme. *J Mol Biol* 82:371–391
19. Eriksson AE, Jones TA, Liljas A (1988) Refined structure of human carbonic anhydrase II at 2.0 Å resolution. *Proteins* 4:274–282. doi:[10.1002/prot.340040406](https://doi.org/10.1002/prot.340040406)
20. Stein PE, Leslie AGW, Finch JT, Carrell RW (1991) Crystal structure of uncleaved ovalbumin at 1.95 Å resolution. *J Mol Biol* 221:941–959
21. Bhattacharya A, Grüne T, Curry S (2000) Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin. *Journal of molecular biology* 303: 721. doi:[10.1006/jmbi.2000.4158](https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4158)
22. Lidgi-Guigui N, Leung C, Palmer RE (2008) Weak precursor state binding of protein molecules to size-selected gold nanoclusters on surfaces. *Surf Sci* 602:1006–1009. doi:[10.1016/j.susc.2007.12.025](https://doi.org/10.1016/j.susc.2007.12.025)
23. Prisco U, Leung C, Xirouchaki C et al (2005) Residue-specific immobilization of protein molecules by size-selected clusters. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society* 2:169–175. doi:[10.1098/rsif.2005.0032](https://doi.org/10.1098/rsif.2005.0032)
24. Richards FM (1977) Areas, volumes, packing and protein structure. *Annual review of biophysics and bioengineering* 6:151–176. doi:[10.1146/annurev.bb.06.060177.001055](https://doi.org/10.1146/annurev.bb.06.060177.001055)
25. Pissuwan D, Valenzuela SM, Killingsworth MC et al (2007) Targeted destruction of murine macrophage cells with bioconjugated gold nanorods. *J Nanoparticle Res* 9:1109–1124. doi:[10.1007/s11051-007-9212-z](https://doi.org/10.1007/s11051-007-9212-z)
26. Geoghegan WD, Ackerman GA (1977) Adsorption of horseradish peroxidase, ovomucoid and anti-immunoglobulin to colloidal gold for the indirect detection of concanavalin A, wheat germ agglutinin and goat anti-human immunoglobulin G on cell surfaces at the electron microscopic level: a new method, theory and application. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 25:1187–1200. doi:[10.1177/25.11.21217](https://doi.org/10.1177/25.11.21217)
27. Sharma A, Pasha JM, Deep S (2010) Effect of the sugar and polyol additives on the aggregation kinetics of BSA in the presence of N-cetyl-N, N, N-trimethyl ammonium bromide. *Journal of colloid and interface science* 350:240–248. doi:[10.1016/j.jcis.2010.06.054](https://doi.org/10.1016/j.jcis.2010.06.054)
28. Liu H, Pierre-Pierre N, Huo Q (2012) Dynamic light scattering for gold nanorod size characterization and study of nanorod–protein interactions. *Gold Bull* 45:187–195. doi:[10.1007/s13404-012-0067-4](https://doi.org/10.1007/s13404-012-0067-4)
29. Harris LJ, Larson SB, Hasel KW, Mcpherson A (1997) Refined structure of an intact IgG2a monoclonal antibody. *Biochemistry* 36(7):1581–97

VI.2 Optimisation des nanostructures pour une détection par diffusion Raman exaltée de surface

Les études sur la RPSL nous ont montré que cette méthode de mesure n'est pas la plus appropriée pour l'identification et la détection des protéines. C'est pourquoi nous avons décidé d'utiliser une autre méthode de détection, la diffusion Raman exaltée de surface. La DRES est une technique de détection très sensible permettant la détection de molécule unique [127, 179]. Cette sensibilité est acquise grâce à une exaltation optimale du signal Raman. L'exaltation électromagnétique est due aux plasmons de surface localisés qui entre en résonance avec la longueur d'onde laser. Ainsi, en fonction de la longueur d'onde excitatrice, la relation entre la position de la RPSL et l'intensité DRES n'est pas identique [117, 121, 123]. Les règles d'optimisation de la position de la RPSL pour obtenir le signal DRES maximal dépendent donc de la position de la longueur d'onde excitatrice. Ceci peut provenir du fait que la RPSL est une mesure en champ lointain tandis que la DRES est une mesure en champ proche. La compréhension des différents phénomènes qui sont à l'origine de ces relations permettrait de déterminer les nanostructures optimales en fonction des paramètres de mesures. Par ailleurs, la RPSL est dépendante des propriétés géométriques des nanostructures. La lithographie électronique, ainsi que la lithographie par nanoimpression, permettent de maîtriser l'espace entre les nanostructures, en plus de leur forme et de leur dimension. Elles peuvent donc être utilisées pour fabriquer des substrats DRES reproductibles [91, 173, 180]. L'optimisation de tous ces paramètres, pour différentes longueurs d'ondes excitatrices, permettrait d'obtenir une reproductibilité de l'intensité et de la sensibilité du signal.

La première étude, décrite dans l'article 3, est basée sur des mesures expérimentales de nanostructures non couplées, grâce auxquelles nous avons déterminé une relation permettant de calculer la position optimale de la RPSL en fonction de la longueur excitatrice. Le modèle proposé par Zuloaga [181], basé sur un oscillateur harmonique, a été utilisé pour étudier le décalage entre le champ proche et le champ lointain. Mais celui-ci s'avère inopérant pour décrire les effets observés expérimentalement. Des simulations faites par DDA (Discrete Dipole Approximation) ont donc été réalisées afin de comprendre ce décalage. Pour une nanostructure isolée, l'application du modèle proposé par Zuloaga, et les calculs faits par DDA, n'expliquent pas les résultats expérimentaux et le décalage entre le signal SERS et la position optimale de la RPSL. Cependant, une modélisation par DDA d'un réseau de

nanostructures aboutit à des résultats concordant avec les mesures expérimentales. En utilisant cette modélisation, le calcul de la position de la RPSL en fonction de la longueur excitatrice reproduit les résultats obtenus confirmant la relation que nous avons établie préalablement.

Par la suite, nous avons réalisé une étude des caractéristiques des capteurs DRES basés sur l'utilisation de nanostructures optimisées. L'article 4 présente l'étude de la limite de détection, de la sensibilité et de la reproductibilité du signal DRES obtenue sur des nanocylindres, fabriqués soit par lithographie électronique soit par lithographie par nanoimpression UV. Ces trois critères ont également été analysés sur des nanobâtonnets couplés. Nos résultats nous ont permis de déterminer que la limite de détection atteinte avec les nanocylindres est de l'ordre de 10^{-10} M. La variation de limite de détection due à la longueur d'onde est de seulement un ordre de grandeur. Les mesures faites sur les nanostructures produites par lithographie électronique indiquent un signal DRES reproductible, contrairement à celles produites par lithographie par nanoimpression UV. Avec les nanobâtonnets couplés, il est possible de mesurer des concentrations de l'ordre de 10^{-12} M, soit deux ordres de grandeurs de mieux que les nanocylindres, tout en gardant le même niveau de reproductibilité. Ces données montrent que la lithographie électronique permet la conception d'un biocapteur basé sur la DRES, qui soit sensible et reproductible.

Article 3

Evidence of the discrepancy between the near-field and the far-field using SERS

Florent Colas, **Maximilien Cottat**, Raymond Gillibert, Nicolas Guillot, Nadia Djaker, Nathalie Lidgi-Guigui, Andrea Toma, Enzo Di Fabrizio, Pietro G. Gucciardi, Marc Lamy de la Chapelle¹

en rédaction

Evidence of the discrepancy between the near-field and the far-field using SERS

F. Colas^{1,2}, M. Cottat¹, R. Gillibert¹, N. Guillot¹, N. Djaker¹, N. Lidgi-Guigui¹, A. Toma³, E. Di Fabrizio^{4,5}, P. G. Gucciardi⁶, M. Lamy de la Chapelle¹

¹ *Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Laboratoire CSPBAT, CNRS, (UMR 7244), 74 rue Marcel Cachin, F-93017 Bobigny, France*

² *IFREMER, Detection, Sensors and Measurements Laboratory, Technology Research and Development Department, F-29280 Plouzané, France*

³ *Istituto Italiano di Tecnologia. Via Morego, 30 16163 Genova, Italy*

⁴ *KAUST, King Abdullah University of Science and Technology, Physical Science and Engineering and BESE Divisions, Thuwal, 23955 -6900, Kingdom of Saudi Arabia*

⁵ *University of Magna Graecia, BIONEM lab, Campus Salvatore Venuta, Viale Europa 88100 Germaneto-Catanzaro, Italy*

⁶ *CNR IPCF Istituto per i Processi Chimico-Fisici, Viale F. Stagno D'Alcontres 37, I-98156, Messina, Italy*

Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) is a powerful technique to detect and characterize chemical [1-7] or biological [8-10] species. Due to the high enhancement factor that can be reached in SERS, it has already been demonstrated that molecule can be detected at very low concentrations paving the way to the single molecule sensitivity [11-17]. SERS exploits the optical properties of metallic nanostructures and their resonant interaction with light. It is mainly based on two mechanisms: (i) a chemical [18, 19] and (ii) an electromagnetic [20, 21] effect. The former one results on the adsorption of the first layer of molecule at the metallic surface [22]. Even if this effect is not completely elucidated, it has been assigned to charge transfer or chemical bounds formation between the metallic surface and the molecule. The enhancement factor from chemical effect is estimated to be close to 10^2 [23, 24] whereas it can reach to 10^8 for the electromagnetic one [25, 26]. The chemical effect is then often neglected compared to the electromagnetic one. This latter effect is due to the high enhancement of the electromagnetic field at the vicinity of the nanostructure surface. This near-field (NF) enhancement is directly related to the excitation of the Localized Surface Plasmon (LSP), which is associated to the collective oscillation of the free electron cloud inside the nanostructure. In resonance with an excitation wavelength, the LSP creates a high electromagnetic field close to the nanostructure whose intensity decreases exponentially with the distance to the surface. The electromagnetic effect is the result of two contributions. The first one is due to the enhancement of the excitation field, whereas the second one is the enhancement of the Raman scattering, known as the re-radiation effect [27, 28]. The total enhancement factor, $G(\lambda_0, \lambda_R)$, can then be calculated as the product of the enhancement factor, $f(\lambda_0)$, at excitation wavelength λ_0 with the enhancement factor, $f(\lambda_R)$, at Raman wavelength λ_R corresponding to the considered Raman band. Then, the SERS intensity can be written such as:

$$I_{\text{SERS}} = G(\lambda_0, \lambda_R).I_0 = f^2(\lambda_0).f^2(\lambda_R).I_0 \quad (1)$$

Where I_{SERS} corresponds to the SERS intensity and I_0 is the Raman scattering intensity in absence of nanostructures, e.g. when molecules are deposited on non-enhancing films [29, 30].

The close relation between the LSP resonance (LSPR) and the SERS intensity has already been discussed in the literature [31-36]. It has been shown that it is necessary to finely tune the optical properties of the nanostructures in order to reach the highest enhancement factor. Several studies have claimed that the best enhancement factor is reached for a LSPR position at the average between the λ_0 and λ_R [27, 32, 36]:

$$\lambda_{\text{LSPR}}^{\text{Max}} = \frac{\lambda_0 + \lambda_R}{2} \quad (2)$$

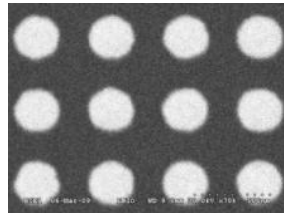
But it has also been demonstrated that such optimization rules depends strongly on the nanoparticle shape [28, 34] and on the excitation wavelength [35, 37]. In these former studies, it has been suggested that the deviation between the expected position of the LSPR for the optimization of the SERS signal and the observed rules are to a specific behavior of the near-field. In this paper, we give evidence of this discrepancy between the near-field and the far field and we demonstrate that in the specific case of nanoparticle arrays it is not due to a spectral shift between the near-field and the far-field but to a near-field intensity change. Moreover, we are able to predict the best enhancement factor for a given λ_0 and thus to propose a general rule for the optimization of the SERS surface.

Results and discussion

The nanoparticles were made by electron beam lithography (EBL) (see methods) on CaF_2 in order to control precisely their geometrical parameters and as a consequence to finely tune

their optical properties [38-40]. The nanoparticles are gold nanocylinders (NC) having different diameter from 50 up to 200 nm in diameter in square array. The distance between the NCs is fixed at 200 nm in both directions to avoid any near-field coupling. To confirm the homogeneity of the nanostructures and the production of highly reproducible NCs, Scanning Electron Microscope (SEM) analysis was performed (Fig. 1).

$\lambda_0 = 632.8 \text{ nm}$



Nanocylinders

FIG 1: Scanning electron microscopy (SEM) image of the antenna array (the white scale bare is 1 μm) and cylinders with a diameter of 200 nm.

Fig. 2a shows the intensity of the investigated Raman band at 1072 cm^{-1} corresponding to a wavelength $\lambda_R = 710 \text{ nm}$. This measurement was done using an excitation wavelength $\lambda_0 = 660 \text{ nm}$. A strong variation of the SERS signal is observed with the LSPR position (one order of magnitude between the highest and lowest signal). The experimental data follow a lorentzian distribution as shown by the black line on Fig 2a. This can be explained by the fact that each plasmon response describes a lorentzian curve [41]. The lorentzian fit points that the highest intensity should be reached for a LSPR at 679 nm (close to a NC diameter of 145 nm , see Fig. 2b). This corresponds to a LSPR located between the λ_0 and λ_R , however it is blue-shifted compared to the expected position $(\lambda_0 + \lambda_R)/2$ (685 nm). This result confirms what we have already published concerning another molecule: bipyridyl ethylene (BPE) [35]. In this paper, the NCs were made on glass with chromium adhesion layer. Two excitation wavelengths were used 633 nm and 785 nm . And the focus of the paper is made on the band at 1200 cm^{-1} .

Despite all of these differences, the same blue shift is observed concerning the LSPR position for the highest intensity compare to what is theoretically expected.

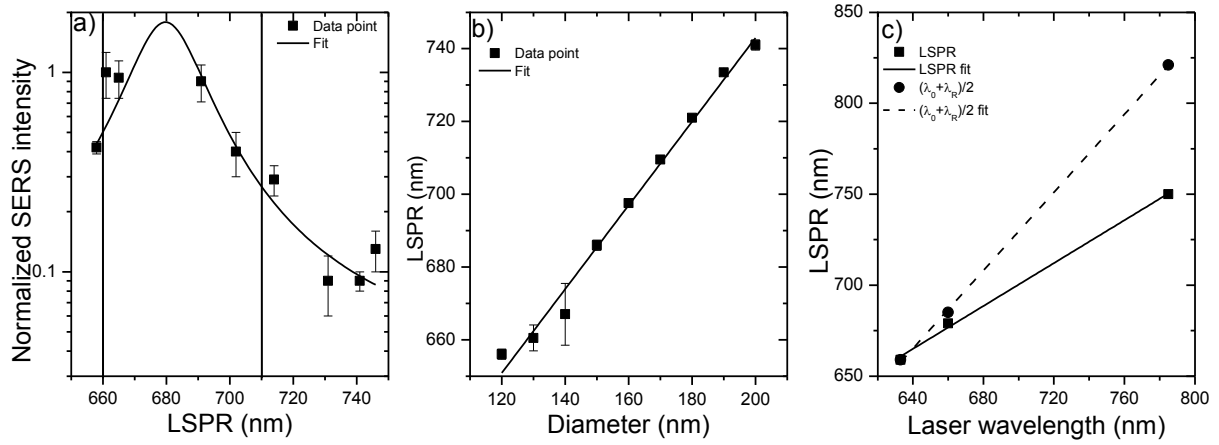


FIG 2: (a) SERS intensity as function of LSPR position for an excitation wavelength of 660 nm and using NC arrays, (b) LSPR position as function of cylinders diameter, (c) observed optimized LSPR position (black square) and expected optimized LSPR position $((\lambda_0 + \lambda_R)/2$, black dots) as function of excitation wavelength. The straight and dashed lines are the linear fit of the experimental and theoretical points.

Since the bands under investigation for BPE and BT are spectrally very close we have summarize the results in Fig. 2c. The experimental LSPR position (dots) is clearly blue shifted compare to the expected one (squares). This shift increases linearly with the excitation wavelength. There is none at 633 nm but it is equal to 71 nm at 785 nm. A specific rule can be determined using the fit of the experimental points. Thus, we assume that the optimized LSPR position for NCs can be calculated as follow:

$$\lambda_{\text{LSPR}} = 0.589 \cdot \lambda_0 + 288$$

With such a law, the best LSPR position can be determined and predicted for a specific laser wavelength, using cylindrical nanostructures.

This observation gives evidence that the “rule” indicating that LSPR should be located at average between λ_0 and λ_R is no more applicable on the whole visible range but depends on the excitation wavelength. Previous studies have attributed this phenomenon to the shift between the plasmon resonance maximum and the maximum field enhancement reached at the particle surface. This experimental shift comes from the fact that the LSPR is measured far from the NC surface while SERS enhancement is a process occurring at the close vicinity of the NC. In other words, the plasmon resonance is a far field (FF) measurement and the SERS is a near field (NF) effect. Grimault et al.[37] explain that their FDTD simulation fails to accurately describe the correlation between LSPR and SERS enhancement because the extinction spectrum does not give enough data to accurately locate the maximum of the SERS gain in NF. In keeping with this idea, Zuloaga et al.[42] explain that the NF spectra of plasmonic nanoparticles are red-shifted compared to their FF spectra by considering the plasmon as a damp driven harmonic oscillator (HO).

The NF to FF discrepancy was then investigated more deeply by numerical modeling using Discrete Dipole Approximation (DDA) with the DDSCAT 7.3.

In a first approach, an individual gold NC was considered on top of a layer of glass, a chromium film of 2 nm thickness in between. The refractive index of gold was taken from Johnson and Chrities and the refractive index of the glass substrate was considered constant and equals to 1.51. The NC top angle was rounded with a radius of curvature of 10 nm to take into account the imperfection of nanoparticles fabrication process. The interdipole length was 2 nm. The height of the NC was 50 nm and the modeled diameters were 100 nm, 128 nm, 148 nm, 180 nm, 200 nm, 248 nm and 300 nm.

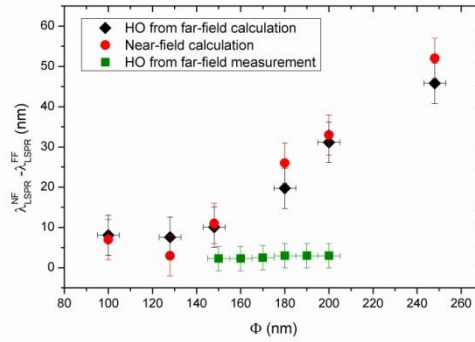
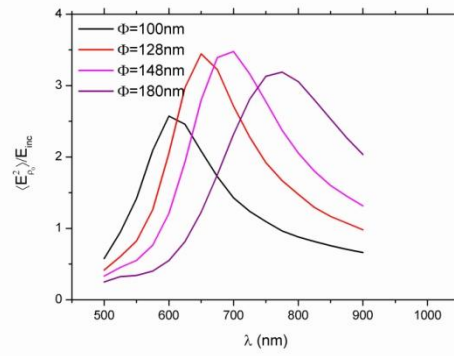
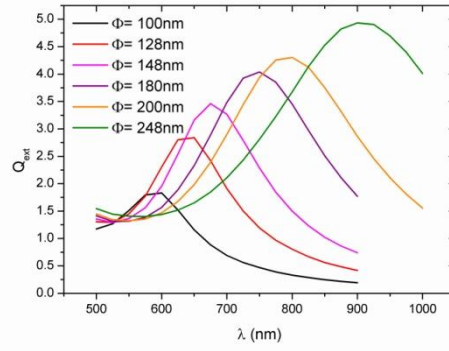


Figure 3: Isolated nanocylinder: a) Extinction efficiency, b) Mean of the density of the square of the electric field in a 2 nm thickness layer around the nanoparticle, c) NF to FF spectral shift.

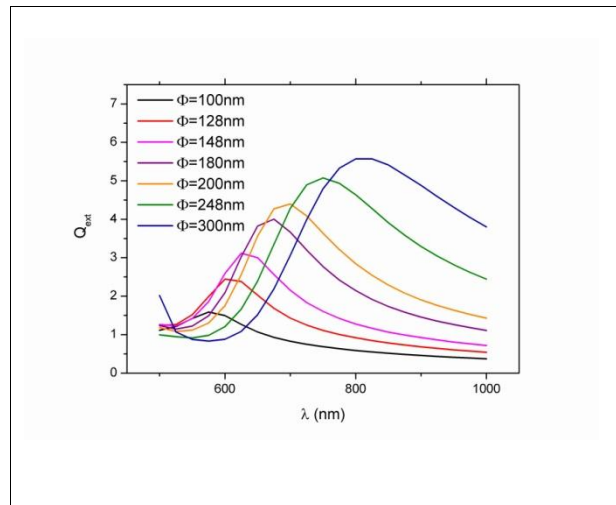
Figure 3a represents the NC extinction efficiency which corresponds to its LSPR spectrum and thus to its FF properties. Fig 3b shows the mean of the density of the square of the electric field in a 2 nm thickness layer around the nanoparticle, that is to say the NC NF feature. The extinction efficiency shows that the plasmon band is red-shifted and gets wider as the diameter of the particle increases, which is consistent with the experimental data and an increase of the radiative damping of bigger particles. The NF plasmon bands present similar behavior. In contrast, they exhibit asymmetry with a positive skewness. It is worth noting that the NF maximum enhancement goes through a maximum and then decreases as the cylinder diameter increases while the FF extinction efficiency maximum keeps on increasing in this range of particle sizes.

Fig 3c compares the results of the DDA calculations and the HO model developed by Zulagoa et al. The black diamonds give the spectral shift between the NF and the FF when the HO model is applied to the LSPR of one individual NC calculated by DDA (Fig 3a). The red dots corresponds to the spectral shift calculated by DDA between the maximum of the extinction spectrum (Q_{ext} on figure 3a) and the maximum of the mean of the density of the square of the electric field given on figure 3b that can be assigned to the enhanced intensity at the nanoparticle vicinity. Both curves follow the same behavior. No significant shift is noted for diameters of 100 nm and 120 nm. Then the NF to FF spectral shift ($\Delta\lambda_{LSPR}^{NF-FF}$) increases steadily with the particles diameter. This is consistent with an increase of the radiative damping due to an increase of the NC volume that assesses the HO model and with the experimental data since the spectral shifts observed between the LSPR position and the SERS measurements are in the same order of magnitude.

However, the calculated spectral shifts are no more consistent when the HO model is applied to the experimental extinction efficiency (green squares on Fig 3c). The spectral shifts are

then very low (in the range of less than 3 nm) and one order of magnitude lower than the experimental one or the one calculated by DDA, or HO on individual nanoparticle. One possible explanation for this discrepancy is the lower FWHM of the experimental extinction efficiency bands compared to the theoretical ones. Previous studies showed that a regular arrangement of nanoparticles may present different extinction properties from the isolated ones. The FWHM of the extinction band is then significantly affected with thinner width and with the presence of very narrow bands on the extinction spectrum. This is why numerical experiments were then run to investigate this effect in the NF range.

NCs were located on a regular square array with a constant inter-particle distance of 200 nm. Figure 4a represents the extinction efficiency of the NC while figure 4b the mean of the density of the square of the electric field in a 2 nm thickness layer around the nanoparticle. The curves displayed on both figures are thinner than in the case of an isolated NC.



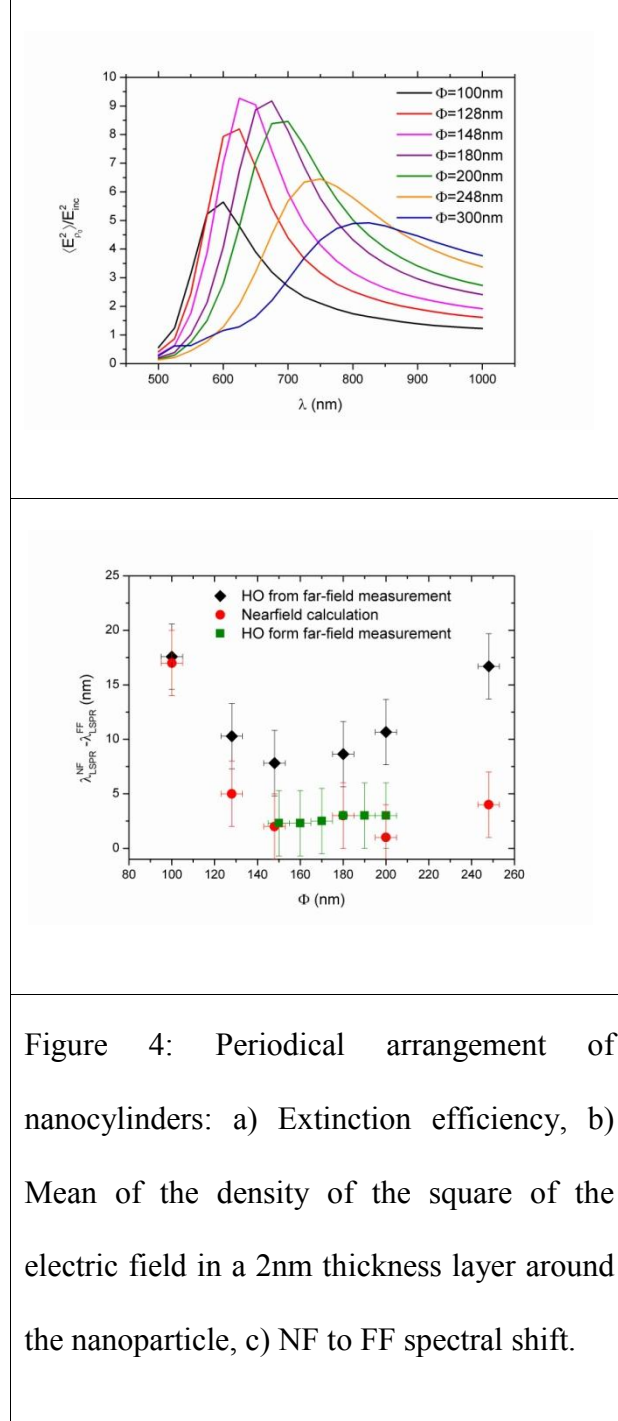


Figure 4: Periodical arrangement of nanocylinders: a) Extinction efficiency, b) Mean of the density of the square of the electric field in a 2nm thickness layer around the nanoparticle, c) NF to FF spectral shift.

A blue-shift of both the FF and NF bands compare to the isolated particle is to be noted. As previously the bands get asymmetric as the particle diameter increases.

Figure 4c represents $\Delta \lambda_{LSPR}^{NF-FF}$ determined by three different ways. Unlike what is described on figure 3c, we observe that the theoretical NF to FF spectral shift calculated by comparing

figure 4a and figure 4b (red dots) is very similar to the spectral shift calculated by applying the HO model to the experimental data set (green squares). It achieves a prediction in accordance to our DDA calculation, in spite of a missing coupling term in the HO model that should be taken into account in the case of periodic arrangement of nanoparticles. As for the HO model applied to the theoretical extinction efficiency calculated by DDA (black diamonds), it leads to slightly larger values.

The comparison between the isolated NC and the assembly of NCs lets suppose that there is no significant red-shift between NF to FF. The influence of the excitation wavelength on the best LSPR position would then come from the overestimation of the FWHM of the theoretical FF plasmon band. We attributed this to the variability of the imaginary part of the gold permittivity.

To understand the dependency of the SERS signal on the position of the FF plasmon band, the theoretical SERS enhancement for a 1200 cm^{-1} band was calculated for three excitation wavelength: 633 nm, 660 nm and 785 nm. The results are plotted on figure 5. In all the cases, the shape of the graph is similar to the plot on figure 2a from experimental data. The enhancement curves obtained for the smallest λ_0 are very similar except for a slight shift in their maximum. In the latter case the maximum enhancement is about 50% lower and the curve wider. As stated above, the SERS enhancement vs. the NC diameter reflects the shape of the plasmon bands. Since they are wider for the higher λ_0 , it is consistent that the SERS enhancement vs. NC will be wider at 785 nm. The direct consequence of this is that the rule of equation 1 is no longer verified for high excitation wavelength.

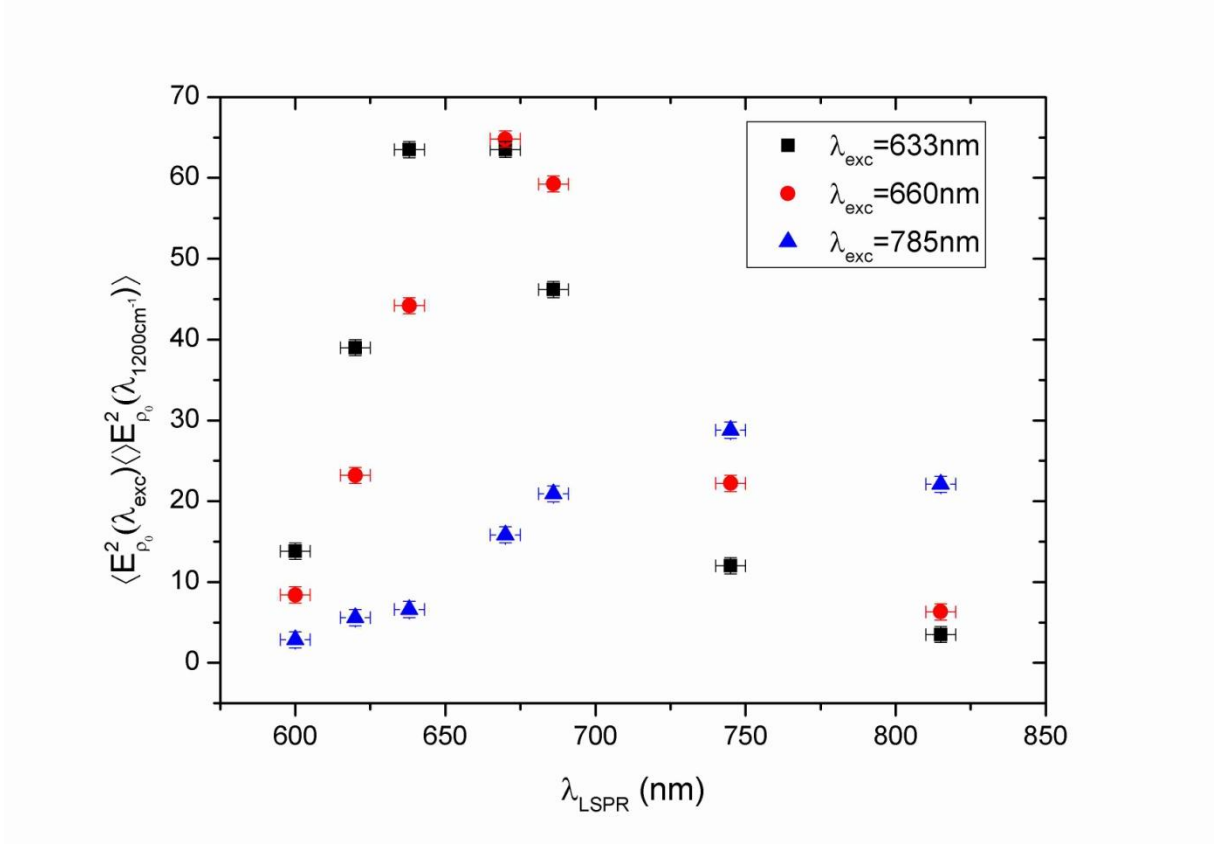


Figure 5: Theoretical enhancement of the 1200 cm^{-1} band of BPE molecule with regard to the nanocylinder diameters for three excitation wavelength (632.8, 660 and 785nm)

λ_{LSPR}^{max} vs. λ_0 is plotted on figure 6 for experimental (red dots) data and DDA calculation (black squares). Both show a very similar linear dependency. The theoretical calculation results are in very good agreements with the experimental data. On the same figure the result of equation 1 is plotted as well. For an excitation wavelength of 633 nm, it is consistent with our results. For larger wavelength, it shows a significant gap. The measured optimal plasmon band position appeared to be blue shift. For small Raman shift, the application of equation 1 leads to a linear change of λ_{LSPR}^{max} with λ_0 with a slope of 1, greater than the slope of about 0.7 calculated by a linear fit of our experimental and DDA data sets. However, previous calculations demonstrated that NF red shifts were not significant in the case of our nanoparticle arrangement.

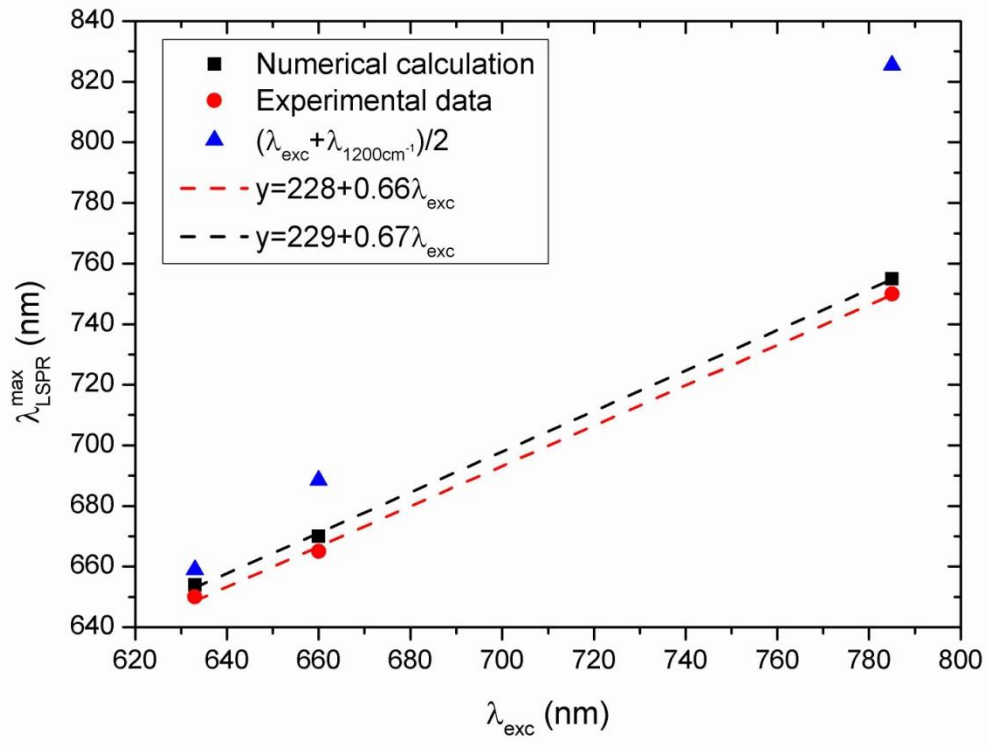


Figure 6: Experimental and theoretical optimal plasmon band position with regard to the excitation wavelength

Methods

Nanostructure fabrication

The gold nanocylinders were produced by EBL on CaF₂ substrates with diameters from 50 nm to 200 nm. The distance between the NC is fixed at 200 nm in both directions to avoid NF coupling. The gold height is 60 nm with a titanium adhesion layer of 3 nm. The samples were cleaned by UV-Ozone process.

The SERS intensity was determined using benzenethiol (BT) (C₆H₅SH, Sigma Aldrich ref. 240249) as a probe molecule. A solution of 1 μM of BT in ethanol was prepared. Samples were immersed in the BT solution for 1h and then rinsed in ethanol twice during five minutes to remove excess molecules. Samples were then dried under nitrogen flow. The BT was chosen because of its high Raman cross section which is around $3 \cdot 10^{-29} \text{ cm}^2$ [43], in contrast with weak Raman cross section, as water which is $1 \cdot 10^{-31}$ [44], or glucose, which is about $5 \cdot 10^{-30} \text{ cm}^2$ [44]. Furthermore, the Raman spectrum of BT is well documented in the literature. It is characterized by four mains peaks [45, 46] at 1000 cm^{-1} , 1023 cm^{-1} , 1072 cm^{-1} and 1574 cm^{-1} assigned to β_{CCC} , β_{CH} , $\beta_{\text{CCC}} + \nu_{\text{CS}}$ and ν_{CC} respectively, where β corresponds to in-plane bending and ν to stretching modes [47, 48]. Moreover, the thiol group (SH) of this molecule interacts strongly with the gold surface favoring the formation of a single BT monolayer on the nanostructures [49, 50].

The LSPR and SERS experiments were made using an Xplora spectrometer and a Laram spectrometer from Horiba scientific. The LSPR measurements were performed collecting the transmitted white light using an objective x20 with a numerical aperture of 0.40. The spectral resolution of these experiments was 0.5 nm. For the SERS measurements, the spectral resolution was 2 cm^{-1} and the signal was collected using a x100 objective with a numerical

aperture of 0.9. The excitation laser wavelengths were 633 (Labram), 660 nm and 785 nm (Xplora). Acquisition time for one spectrum was 60s with 200 μ W power. For each concentration, measurements were done ten times on different points to analyze the reproducibility of the signal. SERS signals were then averaged and a standard deviation was calculated and represented as the error bars.

Acknowledgement

Authors want to acknowledge the European project Nanoantenna(HEALTH-F5-2009-241818) for the financial support. PGG acknowledges University Paris XIII and the MIUR under Project PRIN 2008J858Y7 financial support.

References

1. Chaney SB, Shanmukh S, Dluhy RA, Zhao YP: **Aligned silver nanorod arrays produce high sensitivity surface-enhanced Raman spectroscopy substrates.** *Applied Physics Letters* 2005, **87**(3):031908-031903.
2. Gupta R, Weimer WA: **High enhancement factor gold films for surface enhanced Raman spectroscopy.** *Chemical Physics Letters* 2003, **374**(3–4):302-306.
3. Rodríguez-Lorenzo L, Álvarez-Puebla RnA, Pastoriza-Santos I, Mazzucco S, Stéphan O, Kociak M, Liz-Marzán LM, García de Abajo FJ: **Zeptomol Detection Through Controlled Ultrasensitive Surface-Enhanced Raman Scattering.** *Journal of the American Chemical Society* 2009, **131**(13):4616-4618.
4. Xu H, Bjerneld EJ, Käll M, Börjesson L: **Spectroscopy of Single Hemoglobin Molecules by Surface Enhanced Raman Scattering.** *Physical Review Letters* 1999, **83**(21):4357-4360.
5. Michaels AM, Nirmal M, Brus LE: **Surface enhanced Raman spectroscopy of individual rhodamine 6G molecules on large Ag nanocrystals.** *Journal of the American Chemical Society* 1999, **121**(43):9932-9939.
6. Qian XM, Nie SM: **Single-molecule and single-nanoparticle SERS: from fundamental mechanisms to biomedical applications.** *Chemical Society Reviews* 2008, **37**(5):912-920.
7. Kneipp K, Kneipp H, Kartha VB, Manoharan R, Deinum G, Itzkan I, Dasari RR, Feld MS: **Detection and identification of a single DNA base molecule using surface-enhanced Raman scattering (SERS).** *Physical Review E* 1998, **57**(6):R6281-R6284.
8. Stewart S, Fredericks PM: **Surface-enhanced Raman spectroscopy of peptides and proteins adsorbed on an electrochemically prepared silver surface.** *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 1999, **55**(7–8):1615-1640.
9. Han XX, Zhao B, Ozaki Y: **Surface-enhanced Raman scattering for protein detection.** *Anal Bioanal Chem* 2009, **394**(7):1719-1727.
10. David C, Guillot N, Shen H, Toury T, de la Chapelle ML: **SERS detection of biomolecules using lithographed nanoparticles towards a reproducible SERS biosensor.** *Nanotechnology* 2010, **21**(47):475501.
11. Haynes CL, McFarland AD, Duyne RPV: **Surface-Enhanced Raman Spectroscopy.** *Analytical Chemistry* 2005, **77**(17):338 A-346 A.
12. Saute B, Narayanan R: **Solution-based direct readout surface enhanced Raman spectroscopic (SERS) detection of ultra-low levels of thiram with dogbone shaped gold nanoparticles.** *Analyst* 2011, **136**(3):527-532.
13. Alvarez-Puebla RA, Dos Santos Jr DS, Aroca RF: **Surface-enhanced Raman scattering for ultrasensitive chemical analysis of 1 and 2-naphthalenethiols.** *Analyst* 2004, **129**(12):1251-1256.

14. Kattumenu R, Lee CH, Tian L, McConney ME, Singamaneni S: **Nanorod decorated nanowires as highly efficient SERS-active hybrids**. *Journal of Materials Chemistry* 2011, **21**(39):15218-15223.
15. Nie S, Emory SR: **Probing Single Molecules and Single Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering**. *Science* 1997, **275**(5303):1102-1106.
16. Kneipp K, Wang Y, Kneipp H, Perelman LT, Itzkan I, Dasari RR, Feld MS: **Single Molecule Detection Using Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS)**. *Physical Review Letters* 1997, **78**(9):1667-1670.
17. Le Ru EC, Grand J, Sow I, Somerville WRC, Etchegoin PG, Treguer-Delapierre M, Charron G, Félidj N, Lévi G, Aubard J: **A Scheme for Detecting Every Single Target Molecule with Surface-Enhanced Raman Spectroscopy**. *Nano Letters* 2011, **11**(11):5013-5019.
18. Otto A: **Surface-enhanced Raman scattering of adsorbates**. *Journal of Raman Spectroscopy* 1991, **22**(12):743-752.
19. Kambhampati P, Child CM, Foster MC, Campion A: **On the chemical mechanism of surface enhanced Raman scattering: Experiment and theory**. *The Journal of Chemical Physics* 1998, **108**(12):5013-5026.
20. Schatz G, Young M, Duyne R: **Electromagnetic Mechanism of SERS**. In: *Surface-Enhanced Raman Scattering. Volume 103*, edn. Edited by Kneipp K, Moskovits M, Kneipp H: Springer Berlin Heidelberg; 2006: 19-45.
21. Gersten J, Nitzan A: **Electromagnetic theory of enhanced Raman scattering by molecules adsorbed on rough surfaces**. *The Journal of Chemical Physics* 1980, **73**(7):3023-3037.
22. Persson BNJ, Zhao K, Zhang Z: **Chemical Contribution to Surface-Enhanced Raman Scattering**. *Physical Review Letters* 2006, **96**(20):207401.
23. Jiang X, Campion A: **Chemical effects in surface-enhanced raman scattering: pyridine chemisorbed on silver adatoms on Rh (100)**. *Chemical Physics Letters* 1987, **140**(1):95-100.
24. Valley N, Greeneltch N, Van Duyne RP, Schatz GC: **A Look at the Origin and Magnitude of the Chemical Contribution to the Enhancement Mechanism of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS): Theory and Experiment**. *The Journal of Physical Chemistry Letters* 2013, **4**(16):2599-2604.
25. Le Ru EC, Blackie E, Meyer M, Etchegoin PG: **Surface Enhanced Raman Scattering Enhancement Factors: A Comprehensive Study**. *The Journal of Physical Chemistry C* 2007, **111**(37):13794-13803.
26. Xu HX, Aizpurua J, Kall M, Apell P: **Electromagnetic contributions to single-molecule sensitivity in surface-enhanced Raman scattering**. *Physical Review E* 2000, **62**(3):4318-4324.
27. ZIMMERMANN, #160, F., WOKAUN, A.: **Giant gold clusters stabilized by triphenylphosphine ligands. Characterization by surface enhanced Raman and reflectance spectroscopy**, vol. 73. London, ROYAUME-UNI: Taylor & Francis; 1991.

28. Guillot N, de la Chapelle ML: **The electromagnetic effect in surface enhanced Raman scattering: Enhancement optimization using precisely controlled nanostructures.** *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer* 2012, **113**(18):2321-2333.
29. Le Ru EC, Meyer SA, Artur C, Etchegoin PG, Grand J, Lang P, Maurel F: **Experimental demonstration of surface selection rules for SERS on flat metallic surfaces.** *Chemical Communications* 2011, **47**(13):3903-3905.
30. D'andrea C, Bochterle J, Toma A, Huck C, Neubrech F, Messina E, Fazio B, Marago OM, Di Fabrizio E, de la Chapelle ML *et al*: **Optical Nanoantennas for Multiband Surface-Enhanced Infrared and Raman Spectroscopy.** *Acs Nano* 2013, **7**(4):3522-3531.
31. Haynes CL, Van Duyne RP: **Plasmon Scanned Surface-Enhanced Raman Scattering Excitation Profiles.** *MRS Online Proceedings Library* 2002, **728**:null-null.
32. Felidj N, Aubard J, Levi G, Krenn JR, Hohenau A, Schider G, Leitner A, Aussenegg FR: **Optimized surface-enhanced Raman scattering on gold nanoparticle arrays.** *Applied Physics Letters* 2003, **82**(18):3095-3097.
33. Grand J, Kostcheev S, Bijeon JL, de la Chapelle ML, Adam PM, Rumyantseva A, Léron del G, Royer P: **Optimization of SERS-active substrates for near-field Raman spectroscopy.** *Synthetic Metals* 2003, **139**(3):621-624.
34. Billot L, Lamy de la Chapelle M, Grimault AS, Vial A, Barchiesi D, Bijeon JL, Adam PM, Royer P: **Surface enhanced Raman scattering on gold nanowire arrays: Evidence of strong multipolar surface plasmon resonance enhancement.** *Chemical Physics Letters* 2006, **422**(4-6):303-307.
35. Guillot N, Shen H, Fremaux B, Peron O, Rinnert E, Toury T, de la Chapelle ML: **Surface enhanced Raman scattering optimization of gold nanocylinder arrays: Influence of the localized surface plasmon resonance and excitation wavelength.** *Applied Physics Letters* 2010, **97**(2):023113-023113.
36. McFarland AD, Young MA, Dieringer JA, Van Duyne RP: **Wavelength-Scanned Surface-Enhanced Raman Excitation Spectroscopy.** *The Journal of Physical Chemistry B* 2005, **109**(22):11279-11285.
37. Grimault AS, Vial A, Lamy de la Chapelle M: **Modeling of regular gold nanostructures arrays for SERS applications using a 3D FDTD method.** *Appl Phys B* 2006, **84**(1-2):111-115.
38. Haynes CL, Van Duyne RP: **Nanosphere Lithography: A Versatile Nanofabrication Tool for Studies of Size-Dependent Nanoparticle Optics.** *The Journal of Physical Chemistry B* 2001, **105**(24):5599-5611.
39. Grand J, Adam P-M, Grimault A-S, Vial A, Lamy de la Chapelle M, Bijeon J-L, Kostcheev S, Royer P: **Optical Extinction Spectroscopy of Oblate, Prolate and Ellipsoid Shaped Gold Nanoparticles: Experiments and Theory.** *Plasmonics* 2006, **1**(2-4):135-140.
40. Krenn JR, Weeber JC, Dereux A, Bourillot E, Goudonnet JP, Schider B, Leitner A, Aussenegg FR, Girard C: **Direct observation of localized surface plasmon coupling.** *Physical Review B* 1999, **60**(7):5029-5033.

41. Lamy de la Chapelle M, Shen H, Guillot N, Frémaux B, Guelorget B, Toury T: **New Gold Nanoparticles Adhesion Process Opening the Way of Improved and Highly Sensitive Plasmonics Technologies.** *Plasmonics* 2013, **8**(2):411-415.
42. Zuloaga J, Nordlander P: **On the Energy Shift between Near-Field and Far-Field Peak Intensities in Localized Plasmon Systems.** *Nano Letters* 2011, **11**(3):1280-1283.
43. Aggarwal RL, Farrar LW, Diebold ED, Polla DL: **Measurement of the absolute Raman scattering cross section of the 1584-cm⁻¹ band of benzenethiol and the surface-enhanced Raman scattering cross section enhancement factor for femtosecond laser-nanostructured substrates.** *Journal of Raman Spectroscopy* 2009, **40**(9):1331-1333.
44. McCreery RL: **Raman Spectroscopy for Chemical Analysis**, vol. 157; 2000.
45. Shin KS, Ryoo H, Lee YM, Kim K: **Surface-enhanced Raman scattering of benzenethiol adsorbed on silver-exchanged copper powders.** *Bull Korean Chem Soc* 2008, **29**(2):445-449.
46. Ren B, Picardi G, Pettinger B, Schuster R, Ertl G: **Tip-Enhanced Raman Spectroscopy of Benzenethiol Adsorbed on Au and Pt Single-Crystal Surfaces.** *Angewandte Chemie International Edition* 2005, **44**(1):139-142.
47. Varsanyi G: **Vibrational Spectra of Benzene Derivatives**; 1969.
48. Joo TH, Kim MS, Kim K: **Surface-enhanced Raman scattering of benzenethiol in silver sol.** *Journal of Raman Spectroscopy* 1987, **18**(1):57-60.
49. Wan L-J, Terashima M, Noda H, Osawa M: **Molecular Orientation and Ordered Structure of Benzenethiol Adsorbed on Gold(111).** *The Journal of Physical Chemistry B* 2000, **104**(15):3563-3569.
50. Szafranski CA, Tanner W, Laibinis PE, Garrell RL: **Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Aromatic Thiols and Disulfides on Gold Electrodes.** *Langmuir* 1998, **14**(13):3570-3579.

Article 4

A comparative study of the SERS limit of detection using gold nanocylinders and nanorods dimers fabricated by Electron beam and UV Nanoimprint lithography

Maximilien Cottat, Inga Tijunelyte, Nicolas Guillot, Nathalie Lidgi-Guigui, Andrea Toma, Frédéric Hamouda, Bernard Bartenlian, Enzo Di Fabrizio, Pietro G. Gucciardi, Marc Lamy de la Chapelle

en rédaction

A comparative study of the SERS limit of detection using gold nanocylinders and nanorods dimers fabricated by Electron beam and UV Nanoimprint lithography

M. Cottat¹, I. Tijunelyte¹, N. Guillot¹, N. Lidgi-Guigui¹, A. Toma², F. Hamouda⁴, B. Bartenlian⁴, E. Di Fabrizio⁵, P. G. Gucciardi³, M. Lamy de la Chapelle¹

¹ Laboratoire CSPBAT UMR CNRS 7244, Université. Paris13 – Sorbonne Paris Cité, 74 rue Marcel Cachin, 93017 Bobigny, France

² Istituto Italiano di Tecnologia, via Morego 30, 16163 Genova, Italy.

³ CNR-IPCF, Istituto per i Processi Chimico-Fisici, Viale F. Stagno D'Alcontres 37, 98158 Messina, Italy

⁴ IEF CNRS UMR8622, Université Paris-Sud, Bâtiment 220, Rue Ampère, 91405 Orsay Cedex, France

⁵ KAUST, King Abdullah University of Science and Technology, Physical Science and Engineering and BESE Divisions, Thuwal, 23955 -6900, Kingdom of Saudi Arabia

Abstract

Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) sensors optimization is studied from the point of view of sensitivity and limit of detection (LoD). The device consists in a glass plate decorated with gold nanostructures made by lithography. Nanocylinders were produced by electron-beam lithography (EBL) which produce a highly reproducible array of nanostructures but is time consuming and expensive. An array with the same specifications was fabricated using nano-imprint lithography (NIL). This technique allows the production of nanostructures with the same geometry but on a wider surface and for a reduce cost. EBL was also used to produce gold nanorods dimers. The results show that with the appropriate excitation wavelength nanorods dimers would be the most sensitive and could detect down to the picomolar. The use of NIL is interesting for the production of wide areas of gold nanostructures with a good sensitivity. However, the fabrication process introduces some inhomogeneities in the SERS intensity which conducts to an increase of the LoD.

1. Introduction

Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) is a powerful technique to detect and characterize chemical or biological species [1-5]. The development of SERS substrates has allowed the detection of molecules at very low concentration down to the single molecule [6-10]. The enhancement of the Raman signal of molecules adsorbed on metallic surface is based on two mechanisms which are a chemical effect [11] and an electromagnetic effect [12]. The electromagnetic contribution is the most important, its enhancement factor can reach 10^8 [13] compared to 10^2 [14] for the chemical one. The electromagnetic enhancement is strongly dependent on the Localized Surface Plasmon Resonance (LSPR) that occurs when the free electron cloud is excited by an electromagnetic wave [15]. The oscillation of this electronic cloud creates a strong electromagnetic field around the nanostructures that is responsible for the Raman signal enhancement. The LSPR is mainly dependent on the shape and the size of the nanoparticles [16, 17]. Our work aims to control these parameters with lithography techniques to obtain highly reproducible SERS sensors. It has already been shown that the SERS intensity is closely related to the LSPR position as well as the laser wavelength and as a consequence varies according to the nanostructure shape [18-25]. However, these previous studies were focusing on the optimization of the nanostructured substrates regarding the best SERS enhancement factor. In this letter, we are looking at the sensitivity and the limit of detection (LoD) according to the geometrical parameters of the nanostructures used as SERS substrate. For this we used a well-known Raman reporter, the benzenethiol (BT). The first step of this study is based on our previous study and expose the comparison between two nanocylinders diameters optimized for a two distinct wavelengths is firstly exposed.

Previous results demonstrate that gold nanostructure produced by electron beam lithography (EBL) were highly efficient as SERS substrate [4, 26] since EBL allows a perfect control of the size (down to few nanometers), shape and positioning of the nanostructures and thus of their optical and Raman enhancement properties. Yet, EBL is time consuming and expensive: in average the production of an array of 1 mm x 1 mm of nanocylinders takes a few tens of hours. In a commercialization purpose, this technique is thus barely conceivable. Other lithography techniques exist that can produce regular array

of nanostructures on a wide area [27]. Among them we have chosen the UV nano-imprint lithography (UV-NIL). Using a master mold made by EBL as a template, a stamp is used to imprint the desired designed on any kind of substrate. In order to compare the quality of the samples made by UV-NIL and EBL as SERS sensors, we have made a nanocylinders array with both techniques.

It is of general knowledge that to increase the SERS enhancement factor it is possible to use coupled elongated nanostructures [28-30]. In this case, the SERS signal is improved by two electromagnetic processes: the lightning rod effect (elongated nanoparticles) and the electromagnetic coupling (the very small gap between two nanorods). The nanostructures and small gap reproducibility can be achieved with EBL [31] or UV-NIL [32]. Inhere we propose to use assembly of nanorods dimers made by EBL to look at their efficiency as SERS sensors.

2. Experimental

The gold nanostructures were produced by EBL and UV-NIL in order to control their size, arrangement and shape. Two different types of gold nanostructures have been made: individual nanocylinders (NCs) and coupled nanorods (NRs). NCs and NRs produced by EBL were made on CaF_2 substrate whereas NCs made by UV-NIL were fabricated on glass substrate. We considered two different NCs diameters, 130 and 200 nm. These diameters have been chosen to give the highest enhancement factors for the respective wavelengths: 660 and 785 nm, and thus to reach the lowest LoD. The distance between two NCs was fixed to 200 nm in both directions to avoid any near-field coupling. NRs length and width were respectively 100 nm and 60 nm. The rods were coupled to form dimers with a gap of 20 nm between two rods. The distance between two dimers was 200 nm in both directions. For both shapes, the gold height was 60 nm. An adhesion layer of chromium (3 nm) has been used in UV-NIL process whereas it is of titanium for EBL nanostructures. Before use, samples were cleaned under UV/Ozone. The homogeneity of the nanostructures was confirmed by Scanning Electron Microscope (SEM) analysis (Figure 1).

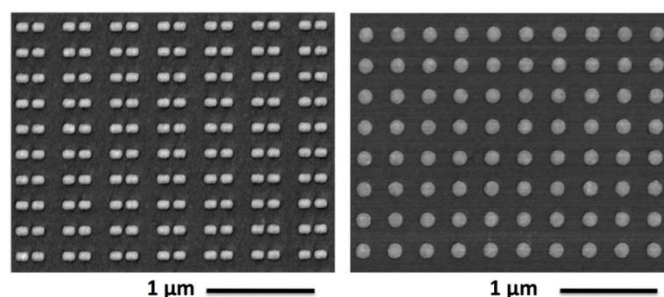


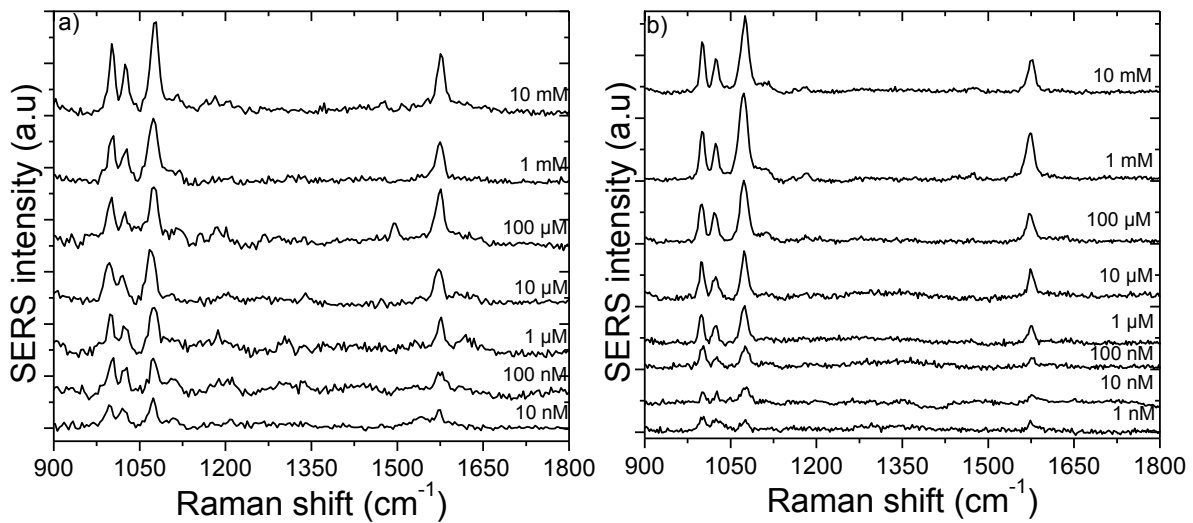
Figure 1: Scanning electron microscopy (SEM) image of the nanorods array (left) and nanocylinders with a diameter of 200 nm (right).

BT ($\text{C}_6\text{H}_5\text{SH}$) was purchased from Sigma Aldrich (ref. 240249). It was chosen because of its high Raman cross section [33]. Furthermore, the Raman spectrum of BT is well known and characterized by four main peaks [34, 35] at 1000 cm^{-1} , 1023 cm^{-1} , 1072 cm^{-1} and 1574 cm^{-1} assigned to β_{CCC} , β_{CH} , $\beta_{\text{CCC}}+\nu_{\text{CS}}$ and ν_{CC} respectively, where β corresponds to in-plane bending and ν to stretching modes (Figure 2) [36, 37]. Moreover, this molecule possesses a thiol group (SH) which has a strong affinity with the gold surface. Solutions, from 10^{-10} M to 10^{-3} M , were made based on a solution of 10 mM prepared by the dilution of 5 μL of BT (10 M) in 5 ml of ethanol. Samples were immersed in the solution for 1h to adsorb BT on the nanostructures. Then, samples were thoroughly rinsed in ethanol to remove excess of BT. Samples were dried under nitrogen. We assume that a monolayer of BT is formed at the nanostructure surface [38, 39].

The SERS experiments were performed using an Xplora spectrometer from Horiba scientific. The excitation laser wavelengths were 660 nm and 785 nm with a power of 200 μW . The signal was collected using an x100 objective with a numerical aperture of 0.9 and the spectral resolution was 2 cm^{-1} . Acquisition time for one spectrum was 60s. In order to analyze the reproducibility of the signal for each nanoparticle geometry, measurements were done several times on different points of the SERS substrate for each concentration. The SERS spectra presented in this article (Figures 2 and 3) were obtained by averaging these measurements. The error bars displayed in figure 3 stands for the standard deviation of the measurements.

3. Results and discussion

Based on our previous work [19], for cylinders made by EBL, we have determined the diameter for which the best SERS signal is reached for excitation wavelengths of 660 nm and 785 nm: 130 nm and 200 nm, respectively. We have thus investigated the LoD and the sensitivity of each SERS nanosensors with their corresponding best excitation wavelength. Figure 2a and 2b represent SERS spectra of BT deposited on EBL samples after baseline correction, for excitation wavelengths of 660 nm and 785 nm respectively and for concentrations ranging from 1 nM to 10 mM. The behavior of the signal vs concentration is identical for both samples: the SERS signal increases with the concentration and reaches a plateau at 10 μ M. We thus assume that at this specific concentration the nanoparticle surface is saturated and that a BT monolayer is formed. Due to a higher background level [40], the signal/noise ratio is worse at 660 nm (figure 2a) than at 785 nm (Figure 2b). Therefore a lower a lower LoD can be reached at 785nm.



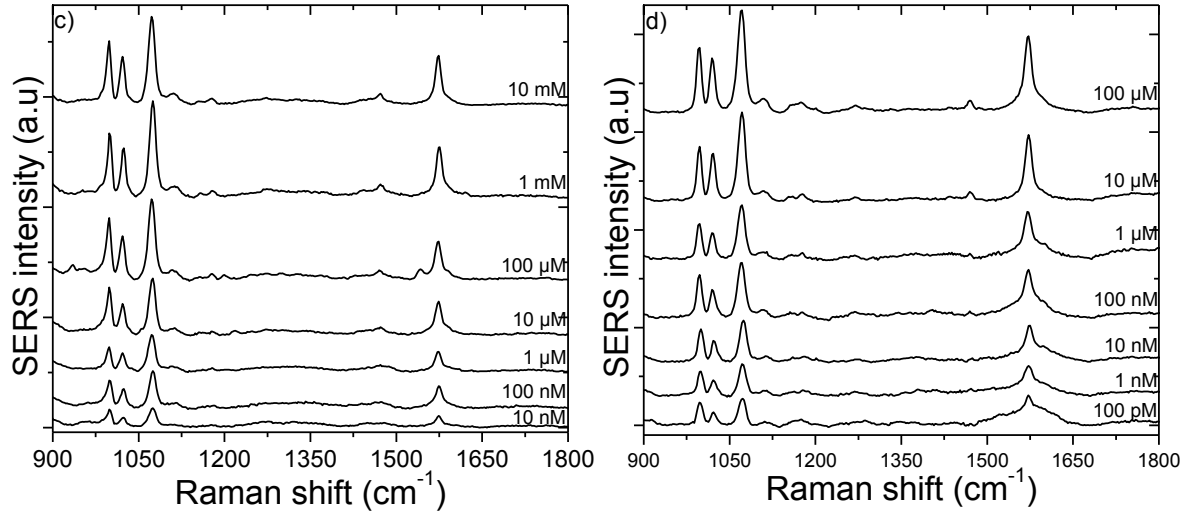


Figure 2: SERS spectra of various concentrations of BT (a) on nanocylinders (EBL) with a diameter of 130 nm and an excitation wavelength of 660 nm, (b) on nanocylinders (EBL) with a diameter of 200 nm and an excitation wavelength of 785 nm, (c) on nanocylinders (UV-NIL) with a diameter of 200 nm and an excitation wavelength of 785 nm and (d) on nanorods dimers (EBL).

The LoD can be estimated from the calibration curve. This latter corresponds to the variation of the SERS intensity depending on the BT concentration as shown on figure 3. The calibration curves were done using the peak intensity at 1072 cm^{-1} . The noise level is then evaluated and the LoD can be estimated as the concentration for which the fit of the calibration curve intercept the noise level. At 785 nm the LoD is found to be 1 nM whereas it is 10 nM at 660 nm. One can notice that one order of magnitude is gained using the detection at 785 nm than compare to the one at 660 nm. Moreover, it is noticeable that the signal standard deviation is low as it is estimated to be close to 10% of the signal for both sizes of NCs. Such deviation demonstrates that SERS sensor based on nanocylinders produced by EBL provides reproducible detection with low LoD. The lowest LoD for 785 nm can be explained since the SERS signal measured at the saturation level (above $10\text{ }\mu\text{M}$ for the plateau) is a little bit higher than the one obtained at 660 nm (see table 1).

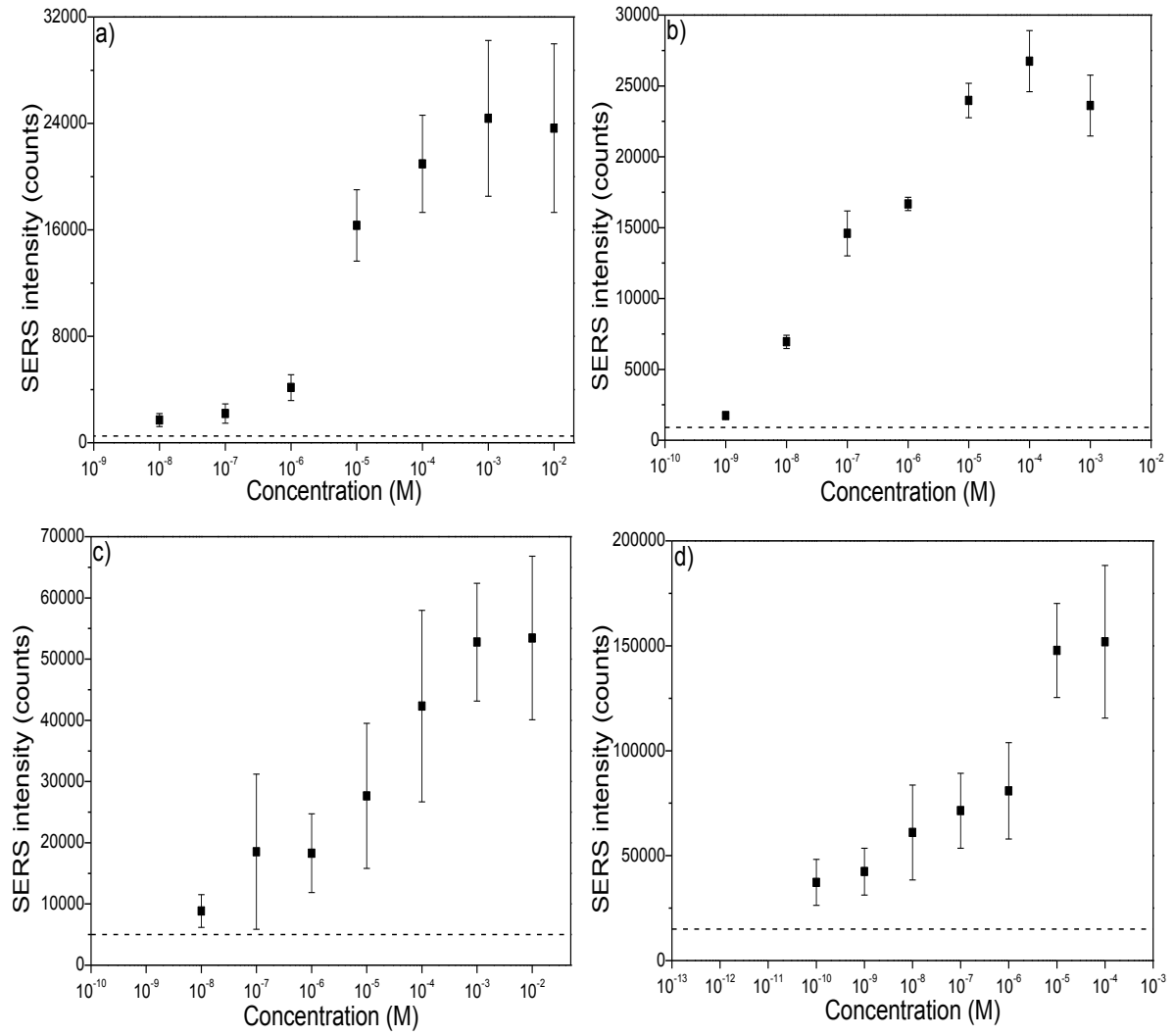


Figure 3: SERS intensity on (a) on nanocylinders (EBL) with a diameter of 130 nm and an excitation wavelength of 660 nm, (b) on nanocylinders (EBL) with a diameter of 200 nm and an excitation wavelength of 785 nm, (c) on nanocylinders (UV-NIL) with a diameter of 200 nm and an excitation wavelength of 785 nm and (d) on nanorods dimers (EBL). The black line is the fit of the data while the dash line indicates the noise level. The left axis corresponds to the normalized SERS signal and the right axis corresponds to the absolute SERS signal.

Thus, since the sensitivities are equal for both wavelengths (table 1), we just observe a vertical shift between both wavelengths. The improvement observed at 785 nm can be due to a better sensitivity of the detection of the Raman spectrometer or by a better near-field enhancement at 785 nm. However, no critical changes are observable between both wavelengths and NC diameters.

We have confronted these results to the LoD and the standard deviation with nanocylinders made by UV-NIL. As shown on figures 2c and 4c, the behavior of the SERS signal is similar as for the EBL samples: the intensities of the peaks increase before a stabilization at 10 μ M. In this case, the LoD

reached is 1 nM, it is comparable to the one reached at 785 nm with the same NCs produced by EBL. However a higher sensitivity is observed. It means that the calibration curve slope is higher and that the determination of the concentration from the SERS intensity should be more precise than with NC made by EBL. Nevertheless, for the UV-NIL NCs, the standard deviation is much higher than for EBL NCs (around 50% of the signal). This means that the UV-NIL NCs is produced with lower uniformity and reproducibility leading to higher signal standard deviation. Thus, the UV-NIL technique provides nanosensors with improved characteristics in term of sensitivity but with degraded performances in term of reliability and reproducibility. This can be explained by the fact that UV-NIL nanostructures are much rougher than EBL's one. The surface roughness provides a higher sensitivity due to highly enhanced near-field by the local tips at the nanometer scale but with less reproducibility since the apparition of such local tips are randomly distributed at the NCs surface.

We have then compared our results with gold coupled NRs dimers geometries in order to improve the sensitivity. These new coupled nanoparticles were designed to be used at 785 nm. The excitation field polarization is parallel to the nanogap axis to get the highest coupling between the two NRs [41]. Figure 3d shows that coupled NRs give a lower LoD explained by the fact that with the lowest concentration used (0.1 nM) the signal still exhibits an important signal/noise ratio (Figure 4).

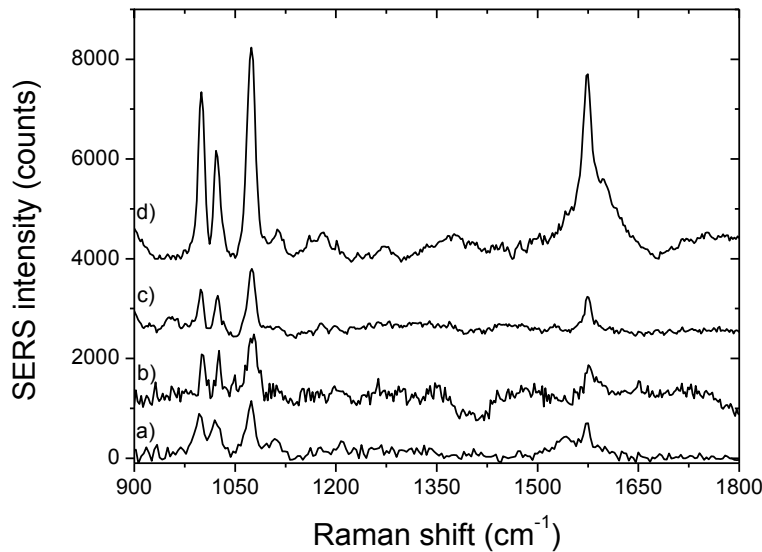


Figure 4: BT raw spectra of 10^{-8} M on (a) on nanocylinders (EBL) with a diameter of 130 nm and an excitation wavelength of 660 nm, (b) on nanocylinders (EBL) with a diameter of 200 nm and an excitation wavelength of 785 nm, (c) on nanocylinders (UV-NIL) with a diameter of 200 nm and an excitation wavelength of 785 nm and (d) on nanorods dimers (EBL).

From figure 4d, one can notice that the lowest signal is much higher than the noise level. Our result show that a LOD of 100 pM is achieved with a signal/noise ratio higher than 10, this suggests that detection limits of 1 pM are possible with this kind of substrates (Figure 3d). This LoD is lower by at least two orders of magnitude than the one reached with nanocylinders at 785 nm produced by EBL or UV-NIL. Moreover, the SERS signal for the surface saturation is largely higher (more than 150 000 counts) than the one observed for the NCs (four time larger than for the EBL NCs and close to three time for UV-NIL NCs) . As expected, the coupled NRs exhibit a higher SERS signal since the NRs coupling form a local hot spot and thus a high near-field enhancement. As a consequence, we measure a higher SERS signal and a highly improved LoD. Moreover, the improvement of the sensor characteristics is not only limited to the signal intensity and to a shift of the calibration curve as observed for the EBL NCs. An increase by a factor two to four of the sensor sensitivity is also induced with a low standard deviation of the measurements.

Table 1: LoD and sensitivity of NCs and NRs according to production method

Nanostructure	Production method	Excitation wavelength (nm)	Highest SERS signal (Counts)	Ratio signal/noise	LoD (M)	Sensitivity (Counts/decade of M)
NC (diameter 130 nm)	EBL	660	24 000	7	10^{-8}	5 000
NC (diameter 200 nm)	EBL	785	26 000	7	10^{-9}	5 000
NC (diameter 200 nm)	UV-NIL	785	55 000	15	10^{-9}	8 000
Coupled NR	EBL	785	150 000	20	10^{-12}	20 000

4. Conclusion

In summary, comparison between different optimized SERS substrates was performed according to their sensitivity and LoD. NCs were produced using EBL with optimized diameters for two different wavelengths. Similar sensitivities were obtained, but a better LoD was reached with an excitation of 785 nm mainly due to the higher signal/noise ratio. EBL is extremely reliable technique for reproducible nanostructure fabrication. However it can hardly be used for the decoration of large substrates. This is why, UV-NIL was proposed as a solution and NCs with the same size than the one produced by EBL were studied. The results show a slightly higher sensitivity and lower LoD but a less good uniformity of the SERS signal intensity. Finally, coupled NRs dimers were produced with EBL since they are known to give a very high SERS enhancement factor and to create local hot-spots. Our results demonstrate that this geometry gives with high reproducibility the best sensitivity and the lowest LoD since concentrations lower than picomolar could be sensed. Such configuration highly improves the sensor performances compared to NCs even when their geometry and optical properties are optimized for SERS. Nanodimers produce on large area with innovative lithography techniques such as UV-NIL could thus be the solution for the next generation of commercially available SERS sensors

5. Acknowledgment

Authors want to acknowledge the European project Nanoantenna (HEALTH-F5-2009-241818) for the financial support. PGG acknowledges University Paris XIII and the MIUR under Project PRIN 2008J858Y7 financial support.

6. References

1. Gupta R, Weimer WA: **High enhancement factor gold films for surface enhanced Raman spectroscopy**. *Chemical Physics Letters* 2003, **374**(3–4):302-306.
2. Qian XM, Nie SM: **Single-molecule and single-nanoparticle SERS: from fundamental mechanisms to biomedical applications**. *Chemical Society Reviews* 2008, **37**(5):912-920.

3. Kneipp K, Kneipp H, Kartha VB, Manoharan R, Deinum G, Itzkan I, Dasari RR, Feld MS: **Detection and identification of a single DNA base molecule using surface-enhanced Raman scattering (SERS).** *Physical Review E* 1998, **57**(6):R6281-R6284.
4. David C, Guillot N, Shen H, Toury T, de la Chapelle ML: **SERS detection of biomolecules using lithographed nanoparticles towards a reproducible SERS biosensor.** *Nanotechnology* 2010, **21**(47):475501.
5. Han X, Zhao B, Ozaki Y: **Surface-enhanced Raman scattering for protein detection.** *Anal Bioanal Chem* 2009, **394**(7):1719-1727.
6. Haynes CL, McFarland AD, Duyne RPV: **Surface-Enhanced Raman Spectroscopy.** *Analytical Chemistry* 2005, **77**(17):338 A-346 A.
7. Rodríguez-Lorenzo L, Álvarez-Puebla RA, de Abajo FJG, Liz-Marzán LM: *J Phys Chem C* 2010, **114**:7336.
8. Kneipp K, Wang Y, Kneipp H, Perelman LT, Itzkan I, Dasari RR, Feld MS: **Single Molecule Detection Using Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS).** *Physical Review Letters* 1997, **78**(9):1667-1670.
9. Le Ru EC, Grand J, Sow I, Somerville WRC, Etchegoin PG, Treguer-Delapierre M, Charron G, Félidj N, Lévi G, Aubard J: **A Scheme for Detecting Every Single Target Molecule with Surface-Enhanced Raman Spectroscopy.** *Nano Letters* 2011, **11**(11):5013-5019.
10. Nie S, Emory SR: **Probing Single Molecules and Single Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering.** *Science* 1997, **275**(5303):1102-1106.
11. Otto A: **Surface-enhanced Raman scattering of adsorbates.** *Journal of Raman Spectroscopy* 1991, **22**(12):743-752.
12. Schatz G, Young M, Duyne R: **Electromagnetic Mechanism of SERS.** In: *Surface-Enhanced Raman Scattering. Volume 103*, edn. Edited by Kneipp K, Moskovits M, Kneipp H: Springer Berlin Heidelberg; 2006: 19-45.
13. Le Ru EC, Blackie E, Meyer M, Etchegoin PG: **Surface Enhanced Raman Scattering Enhancement Factors: A Comprehensive Study.** *The Journal of Physical Chemistry C* 2007, **111**(37):13794-13803.
14. Valley N, Greeneltch N, Van Duyne RP, Schatz GC: **A Look at the Origin and Magnitude of the Chemical Contribution to the Enhancement Mechanism of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS): Theory and Experiment.** *The Journal of Physical Chemistry Letters* 2013, **4**(16):2599-2604.
15. Hao E, Schatz GC: **Electromagnetic fields around silver nanoparticles and dimers.** *The Journal of Chemical Physics* 2004, **120**(1):357-366.
16. Grand J, Adam P-M, Grimault A-S, Vial A, Lamy de la Chapelle M, Bijeon J-L, Kostcheev S, Royer P: **Optical Extinction Spectroscopy of Oblate, Prolate and Ellipsoid Shaped Gold Nanoparticles: Experiments and Theory.** *Plasmonics* 2006, **1**(2-4):135-140.
17. Kelly KL, Coronado E, Zhao LL, Schatz GC: **The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment.** *The Journal of Physical Chemistry B* 2002, **107**(3):668-677.
18. McFarland AD, Young MA, Dieringer JA, Van Duyne RP: **Wavelength-Scanned Surface-Enhanced Raman Excitation Spectroscopy.** *The Journal of Physical Chemistry B* 2005, **109**(22):11279-11285.

19. Guillot N, Shen H, Fremaux B, Peron O, Rinnert E, Toury T, de la Chapelle ML: **Surface enhanced Raman scattering optimization of gold nanocylinder arrays: Influence of the localized surface plasmon resonance and excitation wavelength.** *Applied Physics Letters* 2010, **97**(2):023113-023113.
20. Grimault AS, Vial A, Lamy de la Chapelle M: **Modeling of regular gold nanostructures arrays for SERS applications using a 3D FDTD method.** *Appl Phys B* 2006, **84**(1-2):111-115.
21. Felidj N, Aubard J, Levi G, Krenn JR, Hohenau A, Schider G, Leitner A, Aussenegg FR: **Optimized surface-enhanced Raman scattering on gold nanoparticle arrays.** *Applied Physics Letters* 2003, **82**(18):3095-3097.
22. Grand J, de la Chapelle ML, Bijeon JL, Adam PM, Vial A, Royer P: **Role of localized surface plasmons in surface-enhanced Raman scattering of shape-controlled metallic particles in regular arrays.** *Physical Review B* 2005, **72**(3).
23. Grand J, Kostcheev S, Bijeon JL, de la Chapelle ML, Adam PM, Rumyantseva A, Léron del G, Royer P: **Optimization of SERS-active substrates for near-field Raman spectroscopy.** *Synthetic Metals* 2003, **139**(3):621-624.
24. Billot L, Lamy de la Chapelle M, Grimault AS, Vial A, Barchiesi D, Bijeon JL, Adam PM, Royer P: **Surface enhanced Raman scattering on gold nanowire arrays: Evidence of strong multipolar surface plasmon resonance enhancement.** *Chemical Physics Letters* 2006, **422**(4–6):303-307.
25. Guillot N, de la Chapelle ML: **The electromagnetic effect in surface enhanced Raman scattering: Enhancement optimization using precisely controlled nanostructures.** *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer* 2012, **113**(18):2321-2333.
26. Barbillon G, Bijeon J-L, Plain J, Chapelle M, Adam P-M, Royer P: **Biological and chemical gold nanosensors based on localized surface plasmon resonance.** *Gold Bull* 2007, **40**(3):240-244.
27. Das G, Patra N, Gopalakrishnan A, Zaccaria RP, Toma A, Thorat S, Di Fabrizio E, Diaspro A, Salerno M: **Fabrication of large-area ordered and reproducible nanostructures for SERS biosensor application.** *Analyst* 2012, **137**(8):1785-1792.
28. Alexander KD, Hampton MJ, Zhang S, Dhawan A, Xu H, Lopez R: **A high-throughput method for controlled hot-spot fabrication in SERS-active gold nanoparticle dimer arrays.** *Journal of Raman Spectroscopy* 2009, **40**(12):2171-2175.
29. Chaney SB, Shanmukh S, Dluhy RA, Zhao YP: **Aligned silver nanorod arrays produce high sensitivity surface-enhanced Raman spectroscopy substrates.** *Applied Physics Letters* 2005, **87**(3):031908-031903.
30. Gunnarsson L, Bjerneld EJ, Xu H, Petronis S, Kasemo B, Kall M: **Interparticle coupling effects in nanofabricated substrates for surface-enhanced Raman scattering.** *Applied Physics Letters* 2001, **78**(6):802-804.
31. Kessentini S, Barchiesi D, D'Andrea C, Toma A, Guillot N, Di Fabrizio E, Fazio B, Maragó OM, Gucciardi PG, Lamy de la Chapelle M: **Gold Dimer Nanoantenna with Slanted Gap for Tunable LSPR and Improved SERS.** *The Journal of Physical Chemistry C* 2014, **118**(6):3209-3219.
32. Krauss PR, Chou SY: **Sub-10 nm imprint lithography and applications.** In: *Device Research Conference Digest, 1997 5th: 23-25 June 1997* 1997; 1997: 90-91.
33. Aggarwal RL, Farrar LW, Diebold ED, Polla DL: **Measurement of the absolute Raman scattering cross section of the 1584-cm⁻¹ band of benzenethiol and the surface-enhanced Raman scattering cross section enhancement factor for femtosecond laser-nanostructured substrates.** *Journal of Raman Spectroscopy* 2009, **40**(9):1331-1333.

34. Shin KS, Ryoo H, Lee YM, Kim K: **Surface-enhanced Raman scattering of benzenethiol adsorbed on silver-exchanged copper powders.** *Bull Korean Chem Soc* 2008, **29**(2):445-449.
35. Ren B, Picardi G, Pettinger B, Schuster R, Ertl G: **Tip-Enhanced Raman Spectroscopy of Benzenethiol Adsorbed on Au and Pt Single-Crystal Surfaces.** *Angewandte Chemie International Edition* 2005, **44**(1):139-142.
36. Varsanyi G: **Vibrational Spectra of Benzene Derivatives**; 1969.
37. Joo TH, Kim MS, Kim K: **Surface-enhanced Raman scattering of benzenethiol in silver sol.** *Journal of Raman Spectroscopy* 1987, **18**(1):57-60.
38. Wan L-J, Terashima M, Noda H, Osawa M: **Molecular Orientation and Ordered Structure of Benzenethiol Adsorbed on Gold(111).** *The Journal of Physical Chemistry B* 2000, **104**(15):3563-3569.
39. Szafranski CA, Tanner W, Laibinis PE, Garrell RL: **Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Aromatic Thiols and Disulfides on Gold Electrodes.** *Langmuir* 1998, **14**(13):3570-3579.
40. Mahajan S, Cole RM, Speed JD, Pelfrey SH, Russell AE, Bartlett PN, Barnett SM, Baumberg JJ: **Understanding the Surface-Enhanced Raman Spectroscopy "Background"†.** *The Journal of Physical Chemistry C* 2009, **114**(16):7242-7250.
41. Fazio B, D'Andrea C, Bonaccorso F, Irrera A, Calogero G, Vasi C, Gucciardi PG, Allegrini M, Toma A, Chiappe D *et al*: **Re-radiation Enhancement in Polarized Surface-Enhanced Resonant Raman Scattering of Randomly Oriented Molecules on Self-Organized Gold Nanowires.** *Acs Nano* 2011, **5**(7):5945-5956.

VI.3 Biocapteurs fabriqués par lithographie et utilisant la diffusion Raman exaltée de surface

Les travaux présentés précédemment montrent l'optimisation des nanostructures pour l'obtention d'une intensité DRES maximale et reproductible. Ces différentes nanostructures ont donc été utilisées pour la fabrication de biocapteurs. Le développement de biocapteurs sensibles permettant l'identification de biomarqueurs spécifiques est primordial pour la détection précoce de signes cliniques d'une pathologie. La DRES, qui permet la détection et l'identification de protéines en très faible concentration [131, 182], constitue donc une technique appropriée pour la conception d'un biocapteur sensible et spécifique. Par ailleurs, après recouvrement de la surface par une molécule, qui a la capacité d'interagir sélectivement avec la molécule cible, la détection spécifique de biomolécules par DRES a été démontrée [150, 183]. L'utilisation de nanostructures produites par lithographie électronique peut être appliquée à la détection de protéines par DRES [91, 184]. Cependant, le coût est important, ainsi que le temps de fabrication. Une autre technique de lithographie, la lithographie par nanoimpression UV, permet d'obtenir les nanostructures souhaitées pour un faible coût et un court temps de production [185]. Par conséquent, cette technique de fabrication peut être adaptée à la conception d'un biocapteur basé sur la DRES. Les deux articles exposés ci-dessous présentent deux biocapteurs conçus avec ces techniques de lithographie.

Le développement d'un biocapteur conçu par nanoimpression UV a été réalisé et validé en utilisant le système avidine/biotine, ce dernier étant facilement détectable par DRES [186]. Dans un premier temps, un protocole assurant la détection spécifique de l'avidine a été mis au point à l'aide de mesures faites par SPR. Puis ce protocole a été appliqué au biocapteur DRES pour la détection de l'avidine. Les mesures faites par SPR montrent une détection de l'avidine après fonctionnalisation de la surface d'or avec la biotine, ainsi que la spécificité du système. Les résultats DRES indiquent des spectres différents générés à partir de la biotine seule et du complexe avidine/biotine démontrant la détection de l'avidine. La technique de nanoimpression UV est donc une alternative à la lithographie électronique pour la production d'un biocapteur sensible, reproductible et à faible coût.

Nous avons également développé un biocapteur basé sur la DRES pour la détection de la protéine MnSOD, qui est impliquée dans plusieurs pathologies. Les nanostructures ont été

fonctionnalisées avec un aptamère (séquence ADN) spécifique de la MnSOD. Le niveau de détection a été caractérisé en utilisant différentes formes de nanostructures (nanocylindres et nanobâtonnets) fabriquées par lithographie électronique. La spécificité de notre biocapteur a été étudiée en analysant l'interaction de l'aptamère avec une autre protéine que MnSOD, la BSA. Enfin, la détection de la protéine en milieu physiologique (salive et sérum) a été réalisée. Nous montrons que la sensibilité du biocapteur est de l'ordre de la nanomole, pour les cylindres ainsi que pour les bâtonnets. Par ailleurs, les résultats de sélectivité prouvent que l'aptamère utilisé permet la détection spécifique de la protéine d'intérêt. La détection de la protéine dans des liquides biologiques complexes tels que la salive et le sérum a également été permise. Nous avons donc conçu un biocapteur basé sur la DRES qui est sensible, reproductible et spécifique.

Article 5

Soft UV nanoimprint lithography designed highly sensitive substrates for SERS detection

Maximilien Cottat, Nathalie Lidgi-Guigui, Inga Tijunelyte, Grégory Barbillon, Frédéric Hamouda, Philippe Gogol, Abdelhanin Aassime, Jean-Michel Lourtioz, Bernard Bartenlian and Marc Lamy de la Chapelle

en révision (Nanoscale Research Letters)

NANO EXPRESS

Soft UV nanoimprint lithography designed highly sensitive substrates for SERS detection

Maximilien Cottat¹, Nathalie Lidgi-Guigui¹, Inga Tijunelyte¹, Grégory Barbillon^{2*}, Frédéric Hamouda², Philippe Gogol², Abdelhanin Aassime², Jean-Michel Lourtioz², Bernard Bartenlian² and Marc Lamy de la Chapelle¹

Abstract

We report on the use of soft UV nanoimprint lithography (UV-NIL) for the development of reproducible, millimeter-sized and highly-sensitive substrates for SERS detection. The used geometry for plasmonic nanostructures is the cylinder. Indeed, gold nanocylinders (GNCs) were shown to be highly sensitive, specific sensing surfaces. We demonstrated that less than 3×10^6 molecules of avidin contributed to the SERS signal. In addition, high enhancement factor of 5×10^9 was found for our avidin-biotin system. Thus, the soft UV-NIL technique allows to obtain quickly highly sensitive substrates for SERS biosensing on large surfaces (Ex: 1 mm²).

Keywords: Soft UV-NIL; Nanoimprint; SERS biosensors; Avidin; Biotin

Background

Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) technique was shown to be a very effective analytical tool for the detection and identification of molecules thanks to its high sensitivity [1, 2]. It has been widely used for ultrasensitive chemical analysis down to the single molecule sensitivity. Its field of applications is as varied as to include chemical-biochemical analysis, nanostructure characterization as well as biomedical applications [3, 4, 5, 6, 7]. Especially in chemistry, SERS is applied for the detection of conformational changes and structural differences regarding preferred orientations of molecules with respect to a metal surface [8]. The facts that SERS gives a specific fingerprint of a molecule and is sensitive to very small molecules

make it a good candidate for application in the fields of chemical and biological sensors. The SERS enhancement is due to the localized surface plasmon resonance (LSPR) of the metallic nanostructure. The nanostructured LSPR properties need to be designed and strongly controlled in order to produce highly reproducible active SERS substrates [9, 10]. In previous studies, we have discussed the necessity to optimize the size of gold nanocylinders (GNCs) in order to achieve the highest possible SERS enhancement. In addition, we have demonstrated the necessity to optimize the LSPR in the case of each studied molecules [11].

For industrial applications, nanostructured surfaces of at least 1 mm² have to be produced. In the past, Electron Beam Lithography (EBL) has helped us to demonstrate that by optimizing the nanostructure assembly parameter, enhancement factors estimated at 10^5 - 10^7 could be obtained for such proteins as BSA or RNase-A [11]. However, EBL is expensive and time consuming. Techniques to produce large and organized nanostructured assemblies on transparent substrates have been developed since several years in order to maximize Raman scattering enhancement [12, 13]. The most popular is probably the NanoSphere Lithography (NSL) [14]. The advantage of this technique is to obtain large areas (several mm²) of nanostructures on a substrate. However, the shape and arrangement of the nanostructures are more hardly tuned.

In this article, we propose to use another technique called soft UV-Nanoimprint lithography (UV-NIL) [15] in order to fabricate SERS substrates. UV-NIL is bio-compatible, since it can be implemented on any flat surface. Another essential advantage is that the samples produced with the same mold are all identical. This is important to guarantee the reproducibility of the results. We have already demonstrated the use of UV-NIL for the detection of biomolecules using a LSPR shift [16], and for the realization of nanoholes for AFM studies of membrane proteins [17]. Large array of reproducible nanostructures are more and more implemented for SERS, nevertheless they are rarely used for biosensing. Galarreta *et al.* have demonstrated from

*Correspondence: gregory.barbillon@u-psud.fr

²IEF CNRS UMR8622, Université Paris-Sud, Bâtiment 220, Rue Ampère, 91405 Orsay Cedex, France

Full list of author information is available at the end of the article

functionalized nanotriangles obtained by NSL the detection of avidin [18]. We can explain this phenomenon by making several assumptions. First of all, the technologies available to produce large gratings of nanostructures on transparent substrates are quite recent and still the domain of physicists. The second point is that for biodetection the nanoparticles must be functionalized, firstly in order to preserve the biomolecules from surface interactions and secondly to guarantee specific biosensing. Eventually, biomolecules are difficult to handle and have low Raman cross section. In order to determine the properties of our UV-NIL substrates as a SERS sensor and determine its sensing performances, we have chosen to study the biotin/avidin system.

Methods

The fabrication of gold nanocylinders by UV-NIL

Figure 1(a) displays the main steps of the UV-NIL process. The first step of this technique is to fabricate a master mold. As done in previous studies, this master mold was fabricated using EBL on PMMA resist combined with reactive ion etching for the pattern transfer into the silicon substrate (see figure 1(b)). The conditions of this transfer have been published in [17]. The use of a single master mold for all the samples studied here guarantees the reproducibility of the GNCs. The stamps were fabricated with the standard poly(dimethylsiloxane) (PDMS) diluted in hexane solvent in order to reduce the viscosity and thus to improve the penetration of the PDMS in nanoholes [19]. The stamp was pressed against PMMA/AMONIL resists, which were deposited on a glass substrate, using an EVG 620 mask aligner. The addition of solvent in the PDMS stamp also reduces the interface adhesion and allows easy separation between the stamp and the AMONIL resist, which is used for the imprint. We combined this patterning method with subsequent metal deposition and lift-off process. This procedure leads to a very regular grating of GNCs.

Avidin detection

Cysteamine, biotin-NHS, dodecanethiol (DDT), avidin and BSA (Bovine Serum Albumin) were purchased from Sigma Aldrich. The same functionalization procedure was used for GNC (SERS detection) and flat gold film (SPR detection). Gold surfaces were first functionalized with a cysteamine monolayer, by an overnight incubation in a 100 mM solution of cysteamine in water. The surfaces were then thoroughly rinsed with water. In a second step, the samples were dipped in a 10 mM solution of biotin-NHS in dimethylformamide (DMF) and left to react for 2 hours. Afterwards, the sample was thoroughly rinsed first with DMF, then

with water. In order to guarantee that no surface was left unfunctionalized a blocking step was needed. To do that, the nanostructures were soaked in a pure DDT solution for 1h and then rinsed with ethanol and water. In the SERS experiment, a solution of 1 mM avidin was used to demonstrate the sensing ability of the GNCs.

Raman spectrum acquisition

Raman spectra were recorded using a Labram spectrophotometer from Horiba Scientific for all experiments. The acquisition parameter was fixed to 500 s for avidin/biotin system. A 633 nm laser was used for all experiments with a power of 100 μ W. The laser excitation was focused on the substrate using a microscope objective ($\times 80$, N.A. = 0.75) on a 1 μ m spot. The same objective was used to collect the Raman signal from SERS substrates in a backscattering configuration. The Raman spectra were recorded with a spectral resolution of 1 cm^{-1} . All obtained spectra have been corrected for acquisition time and laser power so they can be compared.

SPR measurements

The SPR measurements were recorded using a BIAcore 1990 GE Healthcare system with bare gold chips. It was mainly used to test the biotin functionalization procedure and the specificity of this biotin - DDT layer. For this experiment, increasing concentrations of avidin (0, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, and 100 nM) were used to test the surface sensitivity. Furthermore, the functionalized surface was also exposed to a flow of concentrated BSA (1.5 μ M) in order to determine the surface specificity for avidin detection.

Results and discussion

Gold nanocylinder fabrication

Firstly, the imprint process is realized in the AMONIL, which is deposited on a PMMA resist. The polymerization is performed with UV exposure ($\lambda = 365$ nm) with 10 mW/cm^2 power during time exposure of 20 min. The imprint pressure is 200 mbar. Figure 2(a) shows a cross-section SEM view with nanoholes in the AMONIL resist. The average diameter of holes is around 220 nm and the residual thickness of AMONIL is around 20 nm. Thus, the AMONIL presence in the hole ground needs a specific RIE process. The removal of the residual AMONIL and the PMMA etch conditions have been reported in the reference [17]. During this PMMA etching, we have a good selectivity between the PMMA and AMONIL ($v_{\text{PMMA}} / v_{\text{AMONIL}} = 2.7$). After this etch, a gold thin layer (50 nm) is deposited by electron beam evaporation in order to realize the plasmonic nanocylinders. Previously, an adhesion layer (Cr) for gold is evaporated (3 nm). Figure

2(b) shows SEM image of gold nanocylinder arrays on 1 mm^2 . The obtained dimensions are $\sim 220\text{ nm}$ in diameter, 50 nm for the height, and a periodicity of 400 nm .

Avidin detection

Avidin detection was performed thanks to the GNC functionalization with biotin (to capture avidin) and DDT (to block the remaining clean gold surface). In order to validate the functionalization protocol we have performed SPR measurements on bare gold surface prior to the SERS experiment. Figure 3(a) presents the result of this experiment. These experiments have been done on the same substrate (bare flat gold surfaces) with two different flow cells. Cysteamine, biotin and DDT are very light molecules and they cannot be detected by this technique, this is why only the results concerning the adsorption of BSA and avidin are shown. The first curve (orange) shows the result of avidin adsorption on the functionalized gold surface. Increasing concentrations are successively injected followed by a rinse with water, and the result is seen as a curve with a staircase shape. The response units are sensitive to the refractive index of the gold surrounding layer, so that an increase in the response units, translates as an increased adsorption of proteins. The first injections (i.e. 0 and 0.01 nM) do not correspond to any step because there are too few avidin molecules immobilized on the surface. For 0.03 nM a low step is observed, however this concentration is very low and is not sufficient to fulfill all the biotins presents on the surface. 0.1 nM seems to be a good concentration to start the saturation of the biotinylated gold chip. In order to confirm the binding specificity of avidin to biotin, a second experiment was performed. A high concentration of BSA was injected and rinsed four times before the injection of avidin. Although BSA has been injected the result shows a total recovery of the sensitivity in term of avidin detection. The functionalization route is thus specific to avidin.

SERS results obtained on biotin and avidin with UV-NIL GNCs are shown on Figure 3(b). Since SERS is highly sensitive to the first layer deposited on the gold surface, the red Raman spectrum should then be relevant of the whole functionalization layer (i.e. cysteamine, DDT and biotin). Yet, cysteamine and DDT have a low Raman cross-section, thus, we assume that they would be barely visible and that the red spectrum is mainly due to the biotin molecule in interaction with cysteamine. It is difficult to compare this spectrum with the biotin-NHS powder spectrum. The main reason for this is that the NHS group has been removed during the reaction between biotin and the cysteamine. The main visible peaks in the red spectrum are located at 1145 cm^{-1} , 1202 cm^{-1} , 1276 cm^{-1} ,

1493 cm^{-1} , 1537 cm^{-1} , 1572 cm^{-1} and 1591 cm^{-1} . In a second step avidin was added onto the sample, giving rise to the green spectrum. A new set of peaks is seen revealing the interaction between avidin and biotin. The spectrum of avidin on biotin is quite different from the one of the avidin solution. Two explanations are given for this: the interaction between avidin and biotin (this behavior has already been observed in references [20, 21]), and the fact that the biotin-avidin spectrum has been acquired in dry conditions giving rise to probable conformational changes.

In addition, it is more difficult to make an assumption on the number of detected molecules. This is due to the fact that a functionalization layer was used and hypothesis should be made concerning the quality of the functionalization and the association between the molecules. The comparison between the SERS of avidin-biotin and the Raman spectra of a 1 mM avidin solution and biotin-NHS powder shows that not all the peaks from the avidin powder are found on the avidin-biotin SERS spectrum. An explanation for this is the fact that the SERS experiment has been performed in dry conditions. Conformation changes are probable consequences of drying a protein and this is reflected in the molecule Raman fingerprint. The second noticeable point is that the signals of avidin and biotin-NHS have to be multiplied respectively by 20 and 5 in order to be compared to the SERS spectrum of avidin-biotin. To confirm that this is a proof of the substrate sensitivity, we have calculated the enhancement factor of the UV-NIL SERS substrate. Following the same procedure as in [11] we compared the SERS signal of avidin-biotin to the Raman signal of 1 mM avidin solution. The number of excited molecules in the SERS experiment is estimated to be 2.8×10^6 (assuming that the GNC is entirely covered by avidin, that avidin is a sphere with a diameter of 5 nm and that the collection area is $142\text{ }\mu\text{m}^2$). The volume excited in the Raman experiment is $7 \times 10^{-7}\text{ L}$, so the number of excited molecules is 4.2×10^{14} . If we assume that the peak at 1664 cm^{-1} is shifted to 1630 cm^{-1} due to avidin interactions with biotin and GNC an intensity ratio ($I_{\text{SERS}} / I_{\text{Raman}}$) of 32.5 is measured. Then, the enhancement factor (EF) is given by:

$$EF = \frac{I_{\text{SERS}}}{I_{\text{Raman}}} \times \frac{N_{\text{Raman}}}{N_{\text{SERS}}} \quad (1)$$

where I_{SERS} , I_{Raman} are the SERS and Raman intensities, respectively. N_{SERS} , N_{Raman} are the number of excited molecules in SERS and Raman experiments, respectively. Thus, we found an EF value of $\sim 5 \times 10^9$ for avidin/biotin system. Giving this result and

considering the signal/noise ratio of the SERS spectrum, it would be possible to dilute the concentration of avidin at least 100 times and still be able to detect it. Thus, we assume that we could detect avidin at concentrations in the micromolar range, which is in agreement with the detection limit already calculated for other proteins but using nanocylinders produced by EBL [11].

Conclusion

In summary, we have fabricated a large area SERS substrate using UV-NIL technique. It allows the fabrication of reproducible large area of ordered GNCs. The use of UV-NIL has enabled us to reach comparable results with EBL, but faster and at much lower cost. The GNCs made by UV-NIL are also suitable to detect small molecules when covered with a low density of capture proteins. Thereafter, we used UV-NIL made GNCs to detect proteinaceous molecules. The biotin functionalization of the GNCs made it possible to specifically detect avidin at a concentration of 1 μ M. A SERS enhancement factor of 5×10^9 was calculated. Moreover, we demonstrated that 2.8×10^6 avidin molecules have contributed to the SERS signal. The specificity is achieved thanks to a functionalization layer. Another great advantage of SERS is the fingerprint provided by each molecule making it possible to get incontestable analysis. The UV-NIL based SERS substrates have thus demonstrated their ability in biosensing.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author's contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Acknowledgements

This research was partially funded by the French National Agency ANR-11-ECOT-010-Remantas project and the French National Agency ANR-12-NANO-0016 Piranex project. The publication is supported under the Campus for Research Excellence And Technological Enterprise program.

Author details

¹CSPBAT (UMR7244), CNRS-Université Paris 13, 74 rue Marcel Cachin, 93017 Bobigny, France. ²IEF CNRS UMR8622, Université Paris-Sud, Bâtiment 220, Rue Ampère, 91405 Orsay Cedex, France.

References

- Blackie, E.J., Le Ru, E.C., Etchegoin, P.G.: Single-molecule surface-enhanced raman spectroscopy of nonresonant molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 14466–14472 (2009)
- Le Ru, E.C., Grand, J., Sow, I., Somerville, W.R.C., Etchegoin, P.G., Treguer-Delapierre, M., Charron, G., Félidj, N., Lévi, G., Aubard, J.: A scheme for detecting every single target molecule with surface-enhanced raman spectroscopy. *Nano Lett.* **11**, 5013–5019 (2011)
- Lacharmoise, P.D., Le Ru, E.C., Etchegoin, P.G.: Guiding molecules with electrostatic forces in surface enhanced raman spectroscopy. *ACS Nano* **3**, 66–72 (2009)
- Iosin, M., Toderas, F., Baldeck, P.L., Astilean, S.: Study of protein-gold nanoparticle conjugates by fluorescence and surface-enhanced raman scattering. *J. Mol. Struct.* **924–926**, 196–200 (2009)
- Graham, D., Goodacre, R.: Chemical and bioanalytical applications of surface enhanced raman scattering spectroscopy. *Chem. Soc. Rev.* **37**, 883–884 (2008)
- Stevenson, R., Ingram, A., Leung, H., McMillan, D.C., Graham, D.: Quantitative sers immunoassay for the detection of human psa. *Analyst* **134**, 842–844 (2009)
- Sim, H.R., Wark, A.W., Lee, H.J.: Attomolar detection of protein biomarkers using biofunctionalized gold nanorods with surface plasmon resonance. *Analyst* **135**, 2528–2532 (2010)
- David, C., Foley, S., Mavon, C., Enescu, M.: Reductive unfolding of serum albumins uncovered by raman spectroscopy. *Biopolymers* **89**, 623–634 (2008)
- Guillot, N., Shen, H., Frémaux, B., Péron, O., Rinnert, E., Toury, T., Lamy de la Chapelle, M.: Surface enhanced raman scattering optimization of gold nanocylinder arrays: Influence of the localized surface plasmon resonance and excitation wavelength. *Appl. Phys. Lett.* **97**, 023113 (2010)
- Grand, J., Lamy de la Chapelle, M., Bijeon, J.L., Adam, P.M., Vial, A., Royer, P.: Role of localized surface plasmons in surface-enhanced raman scattering of shape-controlled metallic particles in regular arrays. *Phys. Rev. B* **72**, 033407 (2005)
- David, C., Guillot, N., Shen, H., Toury, T., Lamy de la Chapelle, M.: Sers detection of biomolecules using lithographed nanoparticles towards a reproducible sers biosensor. *Nanotechnology* **21**, 475501 (2010)
- Hering, K., Cialla, D., Ackermann, K., Dörfer, T., Möller, R., Schneidewind, H., Mattheis, R., Fritzsche, W., Rösch, P., Popp, J.: Sers: a versatile tool in chemical and biochemical diagnostics. *Anal. Bioanal. Chem.* **390**, 113–124 (2008)
- Camden, J.P., Dieringer, J.A., Zhao, J., Van Duyne, R.P.: Controlled plasmonic nanostructures for surface-enhanced spectroscopy and sensing. *Acc. Chem. Res.* **41**, 1653–1661 (2008)
- Haynes, C.L., Van Duyne, R.P.: Nanosphere lithography: A versatile nanofabrication tool for studies of size-dependent nanoparticle optics. *J. Phys. Chem. B* **105**, 5599–5611 (2001)
- Chou, S.Y., Krauss, P.R., Renstrom, P.J.: Nanoimprint lithography. *J. Vac. Sci. Technol. B* **14**, 4129–4133 (1996)
- Barbillon, G., Hamouda, F., Held, S., Gogol, P., Bartenlian, B.: Gold nanoparticles by soft uv nanoimprint lithography coupled to a lift-off process for plasmonic sensing of antibodies. *Microelectron. Eng.* **87**, 1001–1004 (2010)
- Hamouda, F., Barbillon, G., Held, S., Agnus, G., Gogol, P., Maroutian, T., Scheuring, S., Bartenlian, B.: Nanoholes by soft uv nanoimprint lithography applied to study of membrane proteins. *Microelectron. Eng.* **86**, 583–585 (2009)
- Galarreta, B.C., Norton, P.R., Lagugné-Labarthe, F.: Sers detection of streptavidin/biotin monolayer assemblies. *Langmuir* **27**, 1494–1498 (2011)
- Hamouda, F., Sahaf, H., Held, S., Barbillon, G., Gogol, P., Moyen, E., Aassime, A., Moreau, J., Canva, M., Lourtioz, J.M., Hanbücken, M., Bartenlian, B.: Large area nanopatterning by combined anodic aluminum oxide and soft uv-nil technologies for applications in biology. *Microelectron. Eng.* **88**, 2444–2446 (2011)
- Fagnano, C., Torreggiani, A., Fini, G.: Raman spectroscopic studies of the anhydrous complexes of avidin and streptavidin with biotin. *Biospectroscopy* **2**, 225–232 (1996)
- Torreggiani, A., Fini, G.: Raman spectroscopic studies of ligand-protein interactions: the binding of biotin analogues by avidin. *J. Raman Spectrosc.* **29**, 229–236 (1998)

Figures

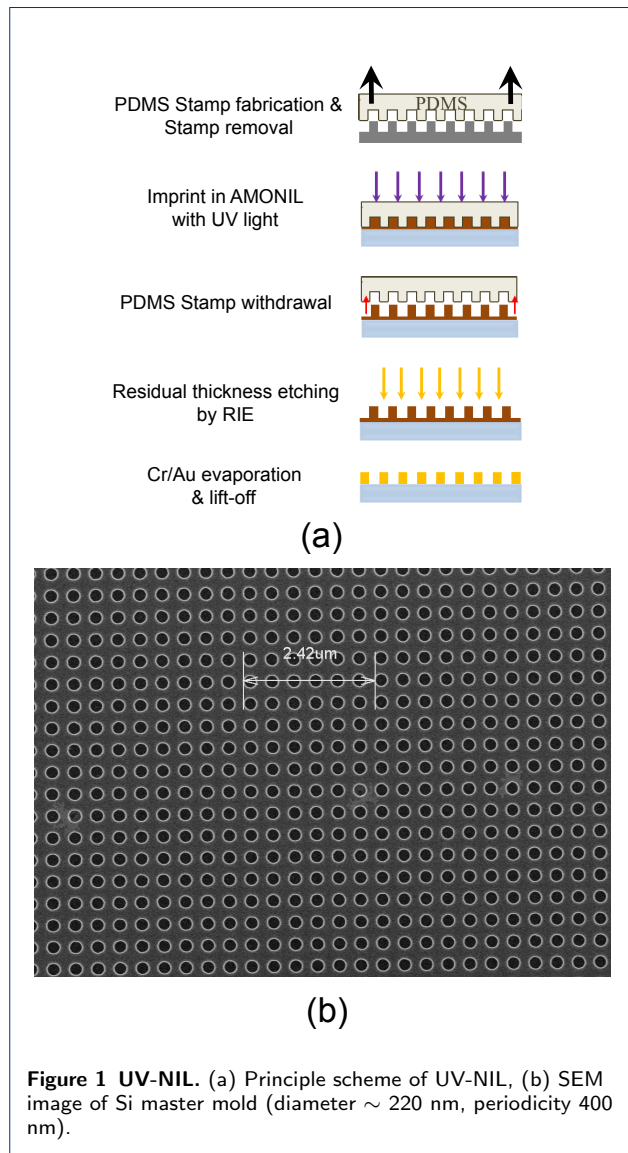


Figure 1 UV-NIL. (a) Principle scheme of UV-NIL, (b) SEM image of Si master mold (diameter ~ 220 nm, periodicity 400 nm).

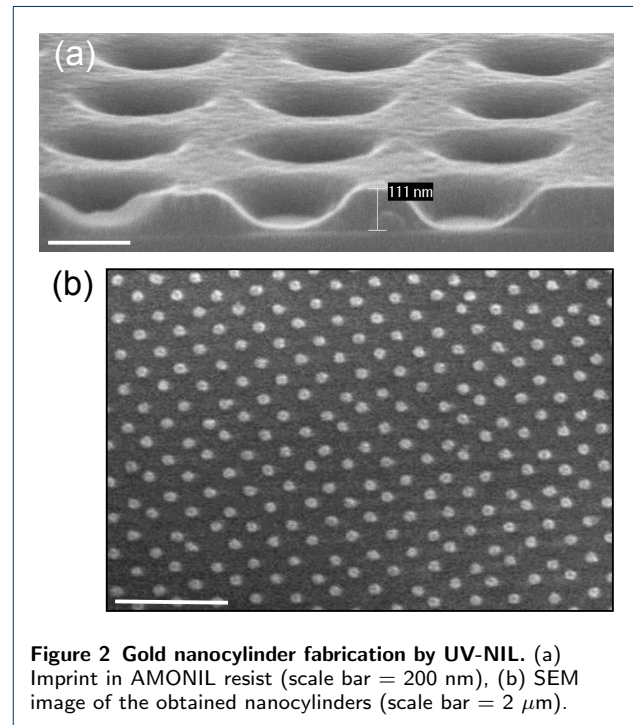


Figure 2 Gold nanocylinder fabrication by UV-NIL. (a) Imprint in AMONIL resist (scale bar = 200 nm), (b) SEM image of the obtained nanocylinders (scale bar = 2 μm).

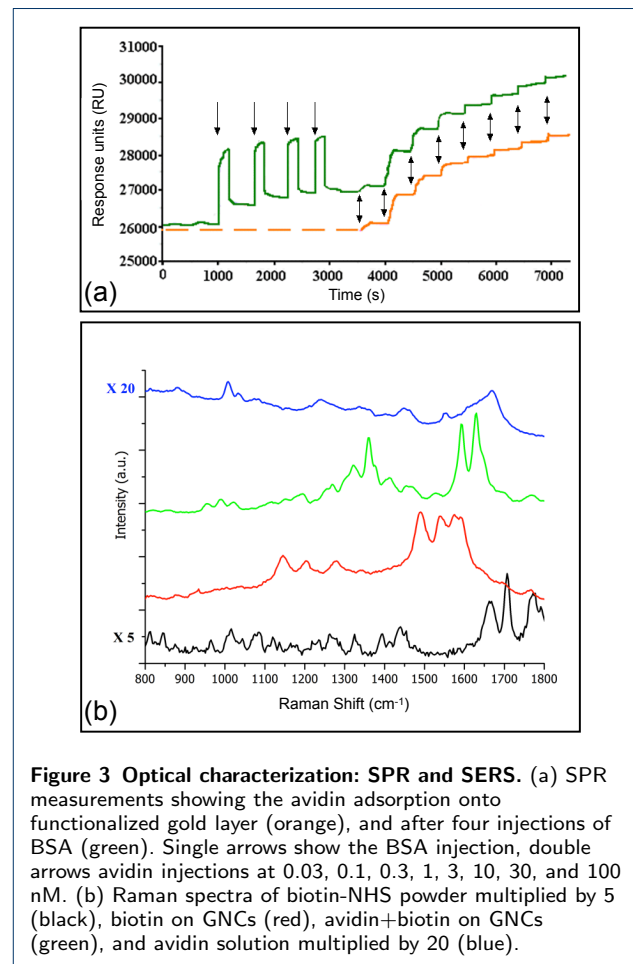


Figure 3 Optical characterization: SPR and SERS. (a) SPR measurements showing the avidin adsorption onto functionalized gold layer (orange), and after four injections of BSA (green). Single arrows show the BSA injection, double arrows show the avidin injections at 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, and 100 nM. (b) Raman spectra of biotin-NHS powder multiplied by 5 (black), biotin on GNCs (red), avidin+biotin on GNCs (green), and avidin solution multiplied by 20 (blue).

Article 6

High sensitivity, high selectivity SERS detection of MnSOD using optical nanoantennas functionalized with aptamers

Maximilien Cottat, Cristiano D'Andrea, Ryohei Yasukuni, Natalia Malashikhina, Ruta Grinyte, Nathalie Lidgi-Guigui, Barbara Fazio, Angela Sutton, Olivier Oudar, Nathalie Charnaux, Valery Pavlov, Andrea Toma, Enzo Di Fabrizio, Pietro G. Gucciardi, Marc Lamy de la Chapelle

en soumission

**High sensitivity, high selectivity SERS detection of MnSOD using optical
nanoantennas functionalized with aptamers.**

*Maximilien Cottat^{1,§}, Cristiano D'Andrea^{2,§}, Ryohei Yasukuni¹, Natalia
Malashikhina³, Ruta Grinyte³, Nathalie Lidgi-Guigui¹, Barbara Fazio², Angela
Sutton⁴, Olivier Oudar⁴, Nathalie Charnaux⁴, Valery Pavlov³, Andrea Toma⁵, Enzo Di
Fabrizio^{6,7}, Pietro G. Gucciardi², Marc Lamy de la Chapelle^{1,*}*

¹ *Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Laboratoire CSPBAT, CNRS, (UMR
7244), 74 rue Marcel Cachin, F-93017 Bobigny, France*

² *CNR IPCF Istituto per i Processi Chimico-Fisici, Viale F. Stagno D'Alcontres 37, I-
98156, Messina, Italy*

³ *Biofunctional Nanomaterials Department, CIC biomaGUNE, Parque tecnológico de
San Sebastian, Paseo Miramon 182, Donostia- San Sebastian 20009, Spain*

⁴ *Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Bioingénierie cardiovasculaire, INSERM,
(U1148), rue Marcel Cachin, 93017, Bobigny, France*

⁵ *Istituto Italiano di Tecnologia. Via Morego 30, 16163 Genova, Italy*

⁶ *KAUST, King Abdullah University of Science and Technology, Physical Science and
Engineering and BESE Divisions, Thuwal, 23955 -6900, Kingdom of Saudi Arabia*

⁷ *University of Magna Graecia, BIONEM lab, Campus Salvatore Venuta, Viale
Europa 88100 Germaneto-Catanzaro, Italy*

[§] These authors have contributed equally to the work presented in this publication

^{*} Corresponding author : marc.lamydelachapelle@univ-paris13.fr

Keywords: SERS, biosensor, plasmon resonance, MnSOD, biomarker, nanoantenna, aptamers

Abstract

In this paper, we present the development of a highly sensitive, specific and reproducible nanobiosensor to detect one specific liver cancer biomarker, the Manganese Super Oxide Dismutase (MnSOD). The high sensitivity and reproducibility was reached by using SERS on gold nanostructures (nanocylinders and coupled nanorods) produced by electron-beam lithography (EBL). The specificity of the detection was provided by the use of a specific aptamer with high affinity to the targeted protein as a recognition element. With such sensor, we have been able to observe the SERS signal of the MnSOD at concentrations down to the nM level and to show with negative control that this detection is specific due to the use of the aptamer. This latter issue has allowed us to detect the MnSOD in different body fluids (serum and saliva) at concentrations in the nM range. We have then demonstrated the effectiveness of our SERS nanobiosensor using aptamer as a bioreceptor for the detection of disease biomarker at low concentration and in complex fluids.

INTRODUCTION

Biosensors development is a very active research field since it will pave the way to new detection methods with improved characteristics (better sensitivity, label free detection, better selectivity...) and since it can have a wide range of applications especially in the medical field such as the disease diagnosis, prognosis or monitoring. Different electrochemical,^{1, 2} optical³⁻⁸ and mechanical⁹⁻¹¹ technologies have been developed with success to detect biological agents, such as microbial toxins¹² and pathogens.^{13, 14} However, even if such techniques proposed improvements and new detection strategies, some major drawbacks can be noticed. The fluorescent techniques need a labeling of the molecules to be detected, which could induce a change in the biomolecule activity and thus a bias in the detection. Quartz crystal microbalance (QCM),¹¹ surface plasmon resonance (SPR)⁸ or Enzyme-linked immunoassay arrays (ELISA)¹ methods, can only permit the detection of the molecule when interacting with the biosensor surface but not its direct identification. The identification, in fact, is done thanks to the use of a bioreceptor at the sensor surface characterized by a high affinity with the targeted biomolecules. However it cannot avoid a non-specific interaction that gives rise to a signal noise that affects the lower limit of detection (LOD). Non-specific interactions affect the signal for concentrations from 10^{-9} M to 10^{-11} M, depending on the affinity constant of the bioreceptor to the targeted analyte. This non-specific detection is known as the biological noise and is one of the main drawbacks of sensors based on the use of a bio-recognition event.⁹ This drawback can be overcome by the design of a bioreceptor having higher affinity than the standard anti-bodies, using, as example DNA aptamers,¹⁵ or by the exploiting of spectroscopic detection methods such as Raman spectroscopy,¹⁶ that can provide a

direct identification of the molecule bound to the bioreceptor,¹⁴ and then distinguish the specific analyte from the non specific ones.

Aptamers are DNA strands that exhibit a higher affinity to proteins than anti-bodies, they have become increasingly important molecular tools for diagnostics and therapeutics since they can be synthesized with high reproducibility and purity from commercial sources, showing a high chemical stability.^{14, 17-21} Raman spectroscopy (RS)²² provides a label free spectral signature of the analyte and represents the right candidate as vibrational technique for a direct identification of the bio-analytes.^{16, 23} Despite the Raman cross section is very low compared to fluorescence (more than 10 orders of magnitude) its sensibility can be improved by exploiting the Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) effect.^{24, 25} The principle of SERS is based on the strong interaction between metallic nanoparticles and light (i.e plasmon resonance, lightning rod effect...) that induces a high local enhancement of the electromagnetic field at the nanoparticle vicinity.²⁶ The nanoparticle, in turn, acts as an optical nanoantenna enhancing the Raman scattering of any molecules deposited at the nanoparticle surface,²⁷ thus providing a total Raman signal amplification of several orders of magnitude (up to 10^9),²⁸ paving the way to the single molecule sensitivity.^{29, 30}

Several SERS biosensors architectures have been proposed in the literature.³¹⁻³⁵ Colloidal nanoparticles permit to achieve the detection of the P38 mitogen-activated protein kinase³⁶ down to 10^{-11} M, being also effective for the detection of biomolecules in body fluids. The detection of folic acid in human serum³⁷ has been demonstrated down to 10^{-8} M, as well as the detection of prostate-specific antigen in serum was achieved down to fM concentrations (~ 1 pg/mL).³⁸ Unfortunately, these kinds of SERS biosensors are affected by several drawbacks that can compromise

such systems. Indeed, the colloidal nanoparticles often aggregate together inducing a change in the SERS enhancement and influencing the reliability of the detection. Such technique is also restricted to water-soluble nanoparticles or molecules. To overcome these disadvantages, the design of well-controlled SERS substrates produced by lithographic methods have been proposed.³⁴

Nanosphere lithography (NSL) or Electron Beam Lithography (EBL) are well known to provide nanostructures with good controlled size, shape and spacing parameters at the nanometric scale, allowing the control and tuning of the localized plasmon resonances and the optimization of the SERS efficiency.^{39, 40 41, 42} Van Duyne's group has demonstrated that sensors produced by NSL are suitable for the detection of glucose,⁴³ also *in vivo*,⁴⁴ or *bacillus anthracis*.⁴⁵ SERS substrates produced by EBL permitted the detection of pure proteins such as Bovine Serum Albumine (BSA), lysozym, RNase, myoglobin at concentrations down to the attomolar.^{46, 47} The possibility to functionalize colloidal metal nanoparticles with aptamers so to obtain a highly specific SERS sensor has been demonstrated on thrombin (LOD of 1 nM in presence of complex biofluids),⁴⁸ adenosine triphosphate (LOD of 12.4 pM),⁴⁹ vasopressin (LOD on the order of 5.2 μ U/mL).⁵⁰ These experimental demonstrations in addition to predictions related to a better optimization of the limit of detections clearly show that the SERS spectroscopy can be a very powerful tool for the detection of biomolecules. Moreover, since the detection is done thanks to the specific spectral signature of analytes, the identification is not done through the bio-recognition event induced by the bioreceptor but directly with the Raman spectrum. This implies (i) that the detection is not disturbed by non-specific interaction with the bioreceptor (that will be directly identify using the SERS) and (ii) that the sensitivity of the detection is mainly related to the high enhancement induced by the nanoparticles and depends in

minor contribution on the affinity of the bioreceptor with the analyte contrary to ELISA or SPR methods.⁵¹

For a complete affirmation of the SERS spectroscopy as new viable alternative tool, however, detection of a larger class of biomarkers is necessary proving that detection thresholds can be better with respect to the best ones reached by the classical techniques as ELISA (typically 10^{-6} – 10^{-8} M) or high-performance liquid chromatography fluorescence (HPLC) (10^{-7} M).

Manganese superoxide dismutase (MnSOD or SOD2) is one of the primary antioxidant enzymes, capable to maintain intracellular reactive oxygen species (ROS) and redox balance for the cell equilibrium, while protecting normal tissue against oxidative stress.^{52, 53} Mukhopadhyay et al. observed an increased expression of MnSOD gene in cancerous cell lines.⁵⁴ Increased activity of MnSOD and of its levels in sera have also been correlated to severe chronic liver diseases and can lead to enhance malignant transformation inducing the development of various carcinoma.⁵⁸⁻

⁶¹ The measurement of the MnSOD concentration in body fluids is then of primarily importance to monitor the clinical course and also the stages of tumors⁶² and provide a diagnosis and a prognosis of the disease at its earliest stage. The most common method used for the MnSOD detection is the immuno-assay and more especially the ELISA test. Under optimum conditions, the sensitivity of ELISA assays permit the detection of 2-200 ng (10^{-5} - 10^{-7} mol/l) of purified MnSOD. The detection threshold of such technique is thus in the range of the micromolar. Moreover, the ELISA is a highly time-consuming technique since it is necessary to wait for several hours to obtain a quantitative result.

In this study, we present a new high specificity, high sensitivity SERS nanobiosensor for the detection of MnSOD. The nanobiosensor combines the high sensitivity offered

by gold nanoantennas produced by EBL^{39, 63} with the high specificity offered by the functionalization of the sensor surface with thiolated aptamers. We demonstrate that thanks to the large enhancement of the local Raman radiation we are able to accomplish label free detection of MnSOD with nanomolar sensitivity in addition to a high selectivity guaranteed by a functionalization with aptamers specifically designed to capture a target protein. We prove the high sensitivity of our nanobiosensor concept by detecting pure protein solutions with nanoantennas featuring two different shapes, namely nanorods dimers and individual nanocylinders, and using two excitation wavelengths in the visible (660nm) and in the NIR (785nm). We validate the specificity of our biosensor with negative controls on BSA. Finally, we demonstrate the detection of this MnSOD at low concentration in two different body fluids, such as sera and saliva.

EXPERIMENTAL SECTION

Materials. Human Manganese SuperOxide Dismutase (MnSOD) was provided by Abfrontier. Potassium chloride (KCl), trizma base, 6-mercapto-1-hexanol (6-MHO), magnesium chloride hexahydrate (MgCl₂), ammonium hydroxide solution 28%-30% (NH₄OH), ethanol and HEPES buffer were purchased from Sigma-Aldrich. 2.0 M triethylamine acetate buffer, trifluoroacetic acid, acetonitrile were provided by Applied Biosystems. MilliQ water (18.2 MΩ) was used to prepare all solutions.

MnSOD aptamers. Thiolated aptamers were prepared on a 3400 DNA synthesizer (Applied Biosystems). Standard DNA phosphoramidites, 5'-thiol-modifier C6-CE phosphoramidite and other reagents required for solid phase oligonucleotide synthesis were purchased from Link Technologies. After synthesis, oligonucleotide was cleaved from the solid support and deprotected by reaction with concentrated NH₄OH during

15h at +55°C while stirring. Oligonucleotide purification cartridges (Applied Biosystems) were used for the following purification of thiolated aptamer. The concentration of pure oligonucleotide was determined by measuring absorbance at $\lambda=260$ nm on ND 1000 Spectrophotometer. This aptamer has been designed using the SELEX method to be specific to the MnSOD protein (for more details see SI-1).

QCM experiments. QCM experiments were performed using a Q-Sense E4 unit (Q-Sense AB, Sweden) and the shifts in frequency (ΔHz) were monitored in real time. The mounted Au-quartz crystal (QSX301, Q-Sense AB) is inserted inside a flow cell (QFM401, Q-Sense) in order to inject the different solutions of interest. The modifications of QCM electrodes and subsequent washings were performed inside of the flow cell. All QCM measurements were undertaken at 23 °C at a flow rate of 100 $\mu L/min$.

Optical nanoantennas. Optical nanoantennas are produced by Electron beam lithography on a glass substrate with a 3 nm adhesion layer of chromium for the 140 nm nanocylinders and on a CaF_2 (100) substrate with a 3 nm adhesion layer of titanium for the nanorod dimers, as described in refs. ^{41, 63}

SERS spectroscopy. We use an Xplora microspectrometer equipped with two different excitation lasers (660 and 785nm) and with a peltier-cooled CCD for signal detection. SERS measurements on the nanorods dimers and on the 200nm diameter nanocylinders are carried out at 785nm, while 660nm excitation is used for the 140nm diameter nanocylinders. A 100X magnification microscope objective with a numerical aperture of 0.9 is used for sample excitation and collection of the back-scattered light. For both excitation wavelengths, the laser spot is nearly diffraction limited with a diameter around 1 μm . The laser power on the sample is always less than 1 mW to prevent sample degradation, while the polarization is parallel to the

gold dimer axis. Acquisition time of each spectrum is 60s. To have a better observation of the spectra, a base line correction has been done using the Raman spectrometer software and the spectra have been normalized with regards to the most intense Raman band.

RESULTS AND DISCUSSION

Aptamers for MnSOD.

Potentially, three different recognition elements for detection of MnSOD could be employed for fabrication of affinity assays: antibodies, $F(ab')_2$ fragments of antibodies and DNA aptamers. Antibodies are comparatively larger than $F(ab')_2$ fragments and DNA aptamers. The size of an antibody is close to 5 nm whereas it is around 2 nm for a $F(ab')_2$ and even lower for an aptamer (estimated to be close to 1 nm). Analytes captured through antibodies on the surface of nanoantennas would then stay too far away from the metal surface for efficient amplification of the Raman signal resulting in loss of sensitivity. $F(ab')_2$ fragments are smaller than the whole antibodies inducing a lower distance between the analyte and the nanoantenna surface. But the procedure for generation of $F(ab')_2$ fragments by breaking the S-S bonds leaves them partially denatured. Therefore, each batch of $F(ab')_2$ fragments shows different apparent affinity constants. The production of DNA with DNA synthesizer is much more convenient and reproducible than the cleavage of antibodies to produce $F(ab')_2$ fragments. On another hand, each batch of DNA aptamers produced with a DNA synthesizer has equal affinity to their target molecules, hence DNA aptamers were employed in this work.

Thiolated aptamers specific for MnSOD (5'- HS- (-O-CH₂-CH₂- O-)₆ TT TTT TTT TTT TTT TTC TTC TCT AGC TGA ATA ACC GGA AGT AAC TCA TCG TTT CGA TGA GTT ACT TCC GGT TAT TCA GCT AGA GAA G-3') are prepared by automated solid-phase oligonucleotide synthesis in a 1 μ M scale (see Methods). The success of the functionalization process is fundamental to maximize the specificity and the sensibility of our sensor. For this aim we used a quartz microbalance (QCM) to determine the affinity of the aptamer to the MnSOD and the surface coverage. We have established a functionalization protocol, schematically illustrated in Figure SI-1, divided in 4 steps that are applied for both QCM and subsequent SERS experiments on the nanoantennas (for more details see SI).

Specific SERS detection of MnSOD

Two different geometries of gold nanoantennas have been fabricated by EBL (see Methods) and exploited to test our nanobiosensor (Figure 1): dimers of nanorods (a) with *length* $L = 100$ nm, *width* $w = 60$ nm, *height* $h = 50$ nm and *gap* $G = 20$ nm, and individual nanocylinders (b) with *diameters* $D = 140$ nm, height of 50 nm. The nanoantennas are arranged in arrays separated by 200 nm to one another in both directions of the plane. The diameters of the nanocylinders (140 nm) have been chosen so to match the excitation wavelength of 660 nm with the optimized position of the plasmon resonance and thus to reach the highest SERS enhancement. The nanorod dimers were designed to be excited at 785 nm.⁶³

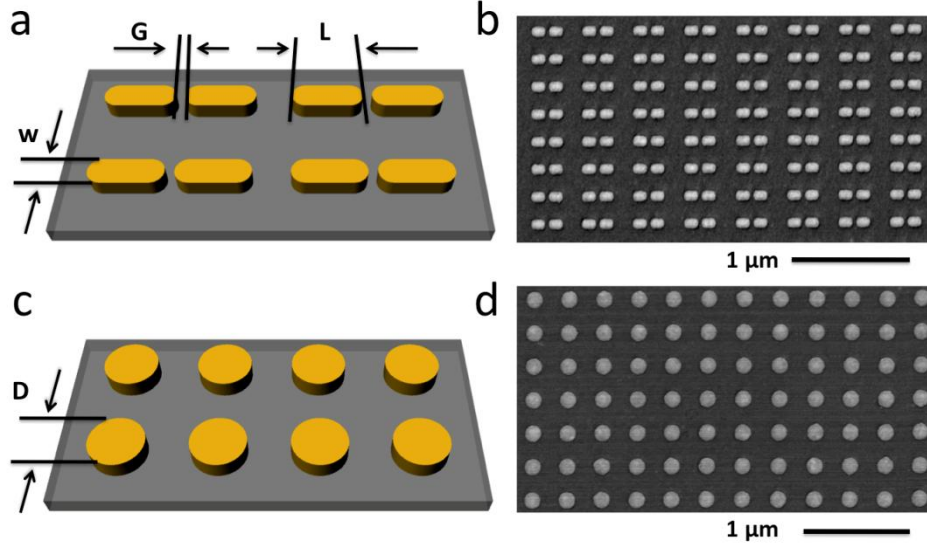


Figure 1: (a, c) Schematic illustrations of the two different plasmonic devices adopted in the present work. The characteristic geometrical parameters are reported (*i.e.* nanorods length L , width w and gap G ; nanocylinder diameter D). Representative scanning electron microscopy (SEM) images of the nanorod dimer arrays and nanocylinders are shown in (b, d), respectively.

The nanoantennas have been functionalized following a protocol similar to that used for the QCM measurements (Figure SI-1, for more details see SI-4). Considering an average surface close to 6 nm^2 occupied by one aptamer, if we assume that the surface functionalization is similar for flat gold surface and gold nanostructures, we can estimate that a nanocylinder with a diameter of 140 nm is covered by 6×10^3 of aptamers whereas a nanorod dimer is covered by 7×10^3 aptamers. The target protein is finally captured by immersing the functionalized nanoantennas in a buffer solution (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, MgCl_2 5 mM, pH 8.2) of MnSOD at various concentrations for 1h, followed by rinsing with buffer and drying under nitrogen flow.

SERS experiments are performed using an Xplora spectrometer from Horiba Scientific (see Methods). First measurements have been targeted at determining the SERS background on the bare nanoantennas^{64,65} and from the SERS generated by the functionalization layer (DNA, and DNA + 6-MOH). As shown in Figure 2 (black line), the signal from the bare antennas (after plasma ozone cleaning) is almost flat with only some vibration peaks of the CaF₂ substrate appearing.⁶⁶ Much stronger signal is observed on antennas coated with the aptamer (Figure 2, red line).

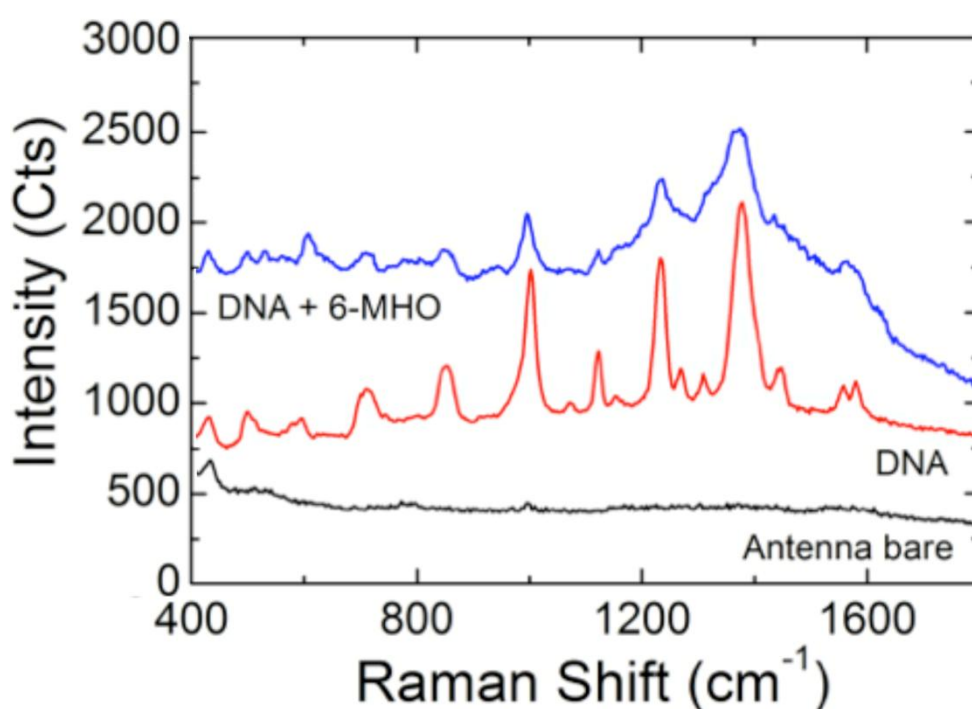


Figure 2: SERS spectra of the gold nanorods dimers ($\lambda_{\text{exc}}=785$ nm) after ozone plasma cleaning (black line), after functionalization with thiolated DNA aptamers (red line) and after the addition of a further blocking layer of 6-MOH (blue line). Data are shown without any background subtraction.

Strongest signal is observed at 1000 cm⁻¹ (C–O stretch in deoxyribose),^{67,68} 1234 cm⁻¹ (Thymine, Ring-CH₃ Stretching),^{67,69-72} and 1380 cm⁻¹ (Thymine, Guanine)^{67,68,70-74} with less intense peaks at and 715 cm⁻¹ (Adenine),^{67,74-77} 850 cm⁻¹ (sugar vibration),⁶⁷

1125 cm^{-1} (PO_2 backbone),^{67, 68} and smaller contributions at 1075 cm^{-1} (PO_2 backbone),^{67, 68, 76} 1234 cm^{-1} (Thymine),^{67, 68, 71} 1301 cm^{-1} (Cytosine),^{70, 71, 75, 78} 1450 cm^{-1} (Cytosine, Thymine),^{68-70, 79} 1556 cm^{-1} (Adenine),^{69, 79} 1580 cm^{-1} (Adenine, Guanine).^{67, 69, 70, 76, 80} The peaks positions agree with the literature on SERS of DNA and DNA bases, while the relative enhancement intensities of the single peaks turns out to be substrate-dependent (materials, shapes).^{67, 68, 70, 71, 76} The surface blocking with 6-MHO (blue curve) does not shift the DNA vibrations, neither provides new peaks to the spectrum, but only yields some increase of the continuum background. A slight decrease of the DNA peaks intensity is observed. Since the 6-MOH has a thiol group as well as the aptamer, it is in competition with the aptamer, and some could be removed from the gold surface. This could explain the intensity decrease. A good reproducibility of the DNA spectra is observed in terms of position of the peaks, intensity along the surface, etc. independently from the nanoantennas shapes and sizes. Spectra acquired on the flat gold surfaces, present on the same substrate and undergone to the same binding process, display only a flat background with no signal from DNA. The noise level associated to this background can be used to provide a lower limit estimate of the SERS enhancement. On the nanoantenna dimers we find enhancements higher than 10^3 , in agreement with what measured using dyes molecular probes.⁴¹

After MnSOD deposition, it is possible to detect locally some high SERS signal of the biomarker using the nanorod dimers substrate. Figure 3 (red line) shows the SERS spectrum of MnSOD at a concentration of 10^{-7} M compared to the signal of the functionalization layer (DNA + 6-MOH). Together with the DNA signal, new intense vibrational peaks (highlighted by the dashed boxes) are observed at 1140 and 1150 cm^{-1} (aliphatic side chain CH_3 bending), 1350 cm^{-1} (CH_2 bending), 1460 cm^{-1} (CH_2

non-aromatic bending), 1536 cm^{-1} and in the $1605 - 1650\text{ cm}^{-1}$ range (Phe, and Amide I region). Most of these peaks, together with other smaller contributions, match the vibrations of MnSOD already detected on lyophilized powder with conventional Raman techniques (see Table SI-1.⁸¹ These results prove that the functionalized nanostructures allow to detect MnSOD via its enhanced Raman signal. The amide III bands are also observable between 1240 and 1300 cm^{-1} .

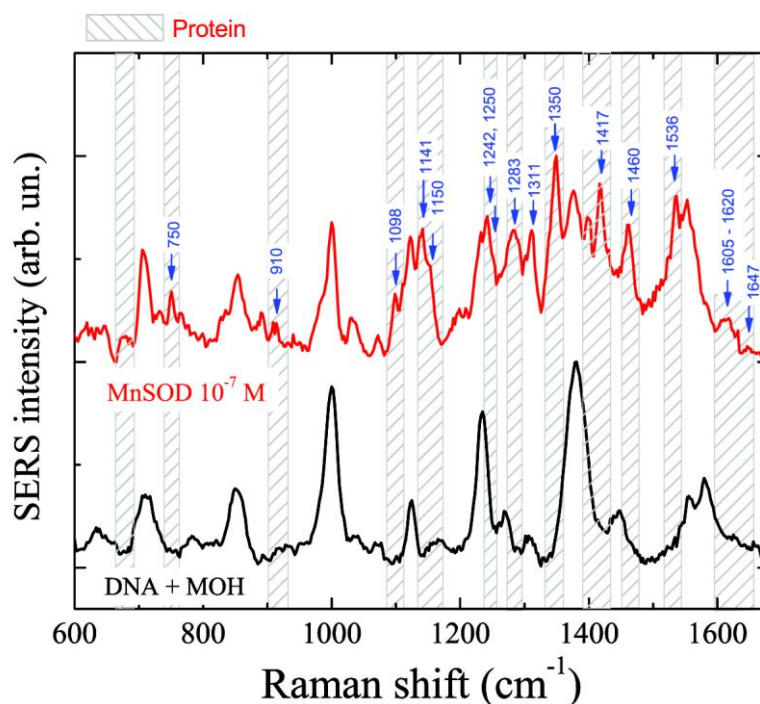


Figure 3: (red line) SERS spectrum of MnSOD after incubation of the functionalized nanoantenna dimers sample with a solution with protein at concentration 10^{-7} M ($\lambda_{\text{exc}}=785\text{ nm}$). In addition to the spectral features arising from of the SERS of the functionalization layer (black line), we can see new peaks due to the protein whose position is labeled (highlighted by the dashed boxes). Spectra are shown after the continuum background removal and offset vertically for clarity reasons.

However, such a strong signal from the protein has not been observed on the whole nanoantennas surface. This can be attributed to the fact that the MnSOD is not distributed homogeneously and its adsorption is non-uniform on the nanobiosensor surface. In order to get rid of such problem and be able to detect the MnSOD up-take on the surface especially at the lowest concentrations, we have established a measurement protocol in which 10 spectra are recorded at different points of the nanobiosensor surface and an average spectrum is calculated, giving information on the presence of the MnSOD.

Any assessment is carried out using, as reference, the SERS signal of MnSOD in the spectral bands highlighted in Figure 3. Experiments to establish the limit of detection (LOD) have been done at increasing concentrations from 10 nM to 1 μ M using both nanorods (Figure 4a) and nanocylinders (Figure 4b). To get rid of non homogenous absorption of the aptamer on the nanoantennas (which would have straightforward consequences on the quantity of MnSOD captured by the nanobiosensor) we plot the spectra normalized to the most intense peak of DNA at 1380 cm^{-1} . In such a way spectra on different substrates, acquired under different experimental conditions can be compared. MnSOD is clearly detected down to 100 nM using both substrates.

The protein SERS spectra show new features with respect to the functionalization layer (also shown in the figures). Main differences arise in the 1490 – 1670 cm^{-1} region, where the characteristic bands of aromatic amino acids (Tyr, Phe), Amide II and Amide I occur. Indeed the signal in this region is much broader than the one of DNA with the appearance of peaks at 1490, 1540, 1610, 1650 cm^{-1} . Less intense spectral signatures of MnSOD are detected also at 1350, 1155 and 754 cm^{-1} (on both substrates) and at 935, 905 and 679 cm^{-1} (using the nanorods). This could be given to

the different enhancement that different vibrational modes can experience, especially when the chemical enhancement plays a role.⁸¹ All these new bands are comparable to the ones observed in the case of high SERS enhancement (Figure 3) and, even if their relative intensity can be different, the MnSOD signal turns out to be well reproducible with the different concentrations and substrates. However, all these differences are smoothed on the average spectrum. This is confirmed since whatever the nanostructure or the excitation wavelength used, the SERS signal did not exhibit relevant changes in the Raman modes (position as well as relative intensity) with the MnSOD concentration. Reducing the MnSOD concentration to 10 nM, we still observe a clear increase of signal in the 1490 – 1670 cm^{-1} region (Figure 4b), proving that our nanobiosensor can attain such LOD. However, at such low concentration, we observed a clear vibrational fingerprint of the protein only using the nanocylinders substrate. In this experimental condition, we believe that the inhomogeneity of the MnSOD uptake starts playing an important role, suggesting that longer incubation times, more dense surface sampling or simply nanoantennas with higher enhancement factor are needed to improve sensitivity and reproducibility.

Moreover, in the case of the nanorod dimers, one can notice that the MnSOD signal is lower than in the case of the nanocylinders and the specific MnSOD features are less visible. First, the geometry of the nanostructure can influence the orientation and position of the aptamer on the nanostructure surface and then on its ability to detect the MnSOD. Second, the enhancement comes essentially from the gap between two nanorods whereas it comes from a larger surface with the nanocylinders. As a consequence, there are less active sites on the dimer surface than on the nanocylinder surface. The probability of capture of MnSOD is lower and then it is more difficult to

observe the MnSOD at lower concentration. Both effects can affect the SERS signal of the MnSOD and explain the differences observable with both geometries.

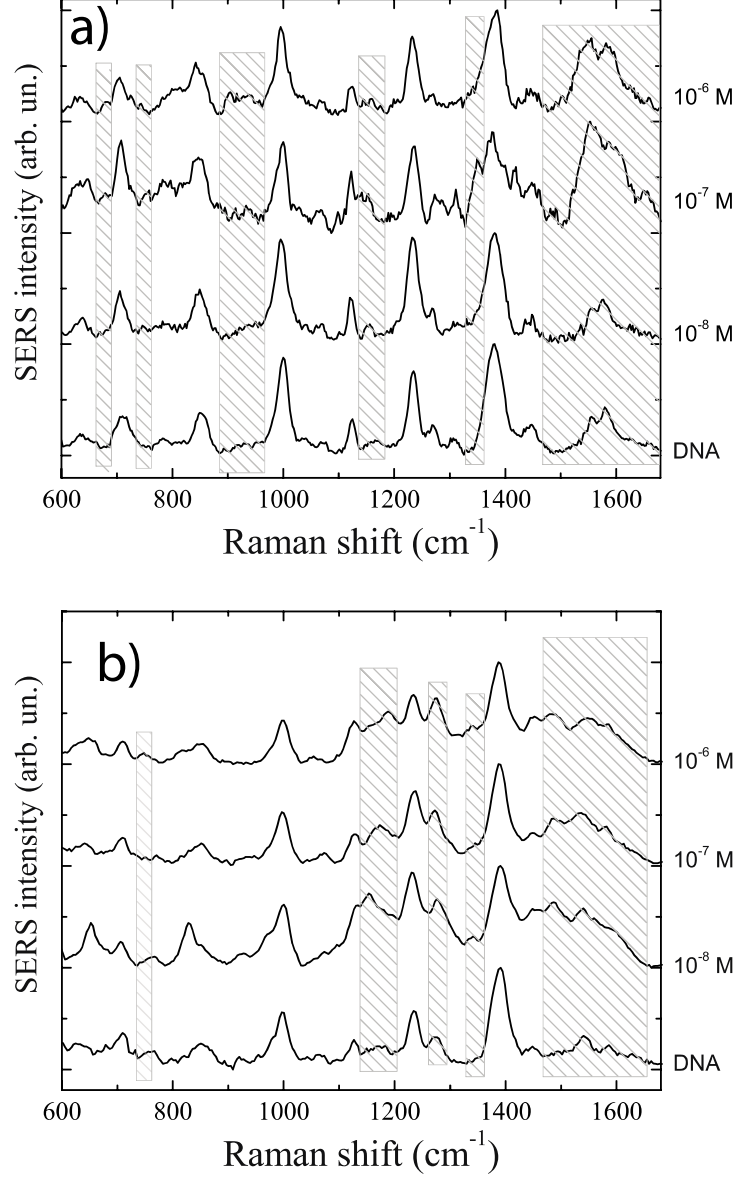


Figure 4: SERS detection of MnSOD at concentrations of 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} M using (a) functionalized nanorods dimers ($\lambda_{\text{exc}}=785$ nm) and (b) functionalized nanocylinders with 140nm diameter ($\lambda_{\text{exc}}=660$ nm). For each SERS substrate the reference SERS spectrum of the functionalization layer is also shown (DNA). The dashed boxes highlight the spectral zones in which the protein provides strongest contribution. The spectra are plotted after background subtraction and offset vertically for clarity.

Our data suggest that we reach a saturation of the SERS surface for a concentration of 100 nM. This saturation level can be explained by the effective surface with which the MnSOD can interact. Indeed, from QCM we have been able to calculate that the K_d is in the range of 300 nM. This value means that half of the aptamers are occupied by a MnSOD protein at this concentration on a flat gold surface. But the surface available with a nanorod dimers or a nanocylinder on a glass substrate is twice or four times lower than the one of the equivalent flat gold surface, respectively. The number of available aptamers is then lower on the SERS substrates and the SERS surfaces are saturated for lower MnSOD concentration as observed experimentally.

In order to demonstrate the specificity of the nanobiosensor we have performed two control experiments. First, we check that proteins different from MnSOD do not give any SERS signal. Second, we show that the blocking agent (6-MOH) alone is not capable to bind MnSOD. For the first test we incubate the nanoantennas functionalized with aptamer in a Bovine Serum Albumin (BSA) solution at a concentration of 10 μ M, i.e. 100 times higher than the one at which we detect MnSOD. As shown in Figure 5, no significant changes are observable between the SERS signal given by the nanobiosensor after incubation with BSA (red line) and the SERS signal from the aptamer+6-MOH layer only (black line), even if the BSA concentration is high enough to saturate the sensor surface. If any interaction had occurred between the BSA and the aptamer, we should have observed some additional signal on the SERS spectrum in spectral zones, such as Amide I, Amide II, Amide III, aromatic amino-acids, specific of proteins, where the contribution of MnSOD is observed (dashed boxes in Figure 5), which is not the case.

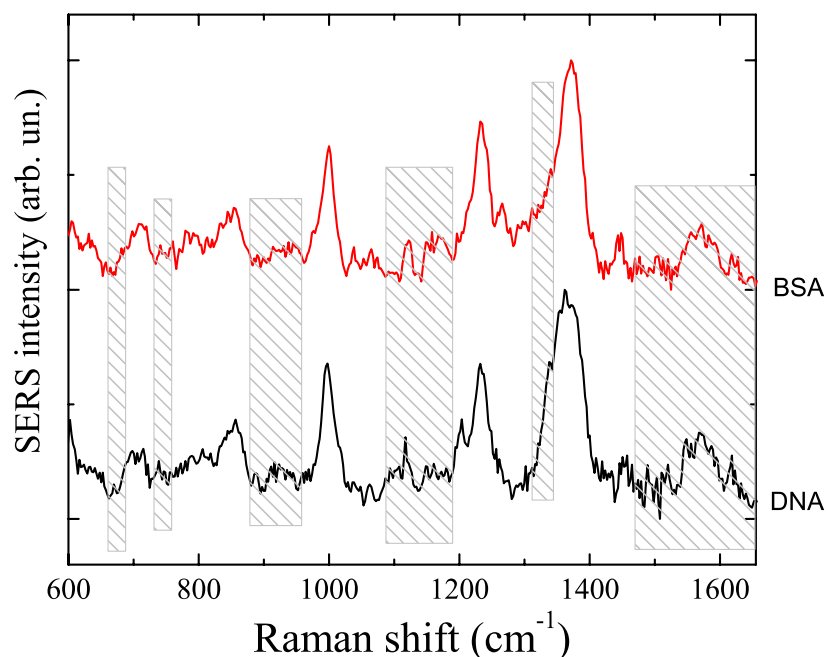


Figure 5: Negative control experiment. The SERS spectrum on gold nanorods dimers ($\lambda_{\text{exc}}=785$ nm) after incubation with BSA 10^{-5} M (red line) does not show specific differences with respect to the SERS from the aptamer+6-MOH layer (black line) in the spectral zones in which the proteins feature their vibrational signal (dashed boxes). Spectra are offset vertically for clarity reasons.

This demonstrates that the non specific binding does not occur with using MnSOD-aptamers to functionalize the nanoantennas and, in addition, that no unspecific binding occurs between BSA and the 6-MOH blocking agent. Same negative results (Figure SI-3) are found when we functionalize the nanoantennas with 6-MOH only and incubate with MnSOD. This second control experiment excludes, as for BSA, any strong unspecific interaction between the blocking layer (6-MOH) and the MnSOD and supports the fact that the capture of the MnSOD is only due to the presence of aptamers on the surface without any significant role played by 6-MOH.

The previous results demonstrate that the designed nanobiosensor is specific and that the MnSOD can be detected at low concentrations. Thus, for further evaluation of the nanobiosensor performances, the detection of MnSOD in complex biological media (saliva and sera samples) has been tested. The MnSOD concentrations are 10^{-8} M in both saliva and serum, as measured by ELISA. The protocol for the MnSOD deposition is the same than the one used for the pure MnSOD except that the pure MnSOD solution is replaced by the body fluid.

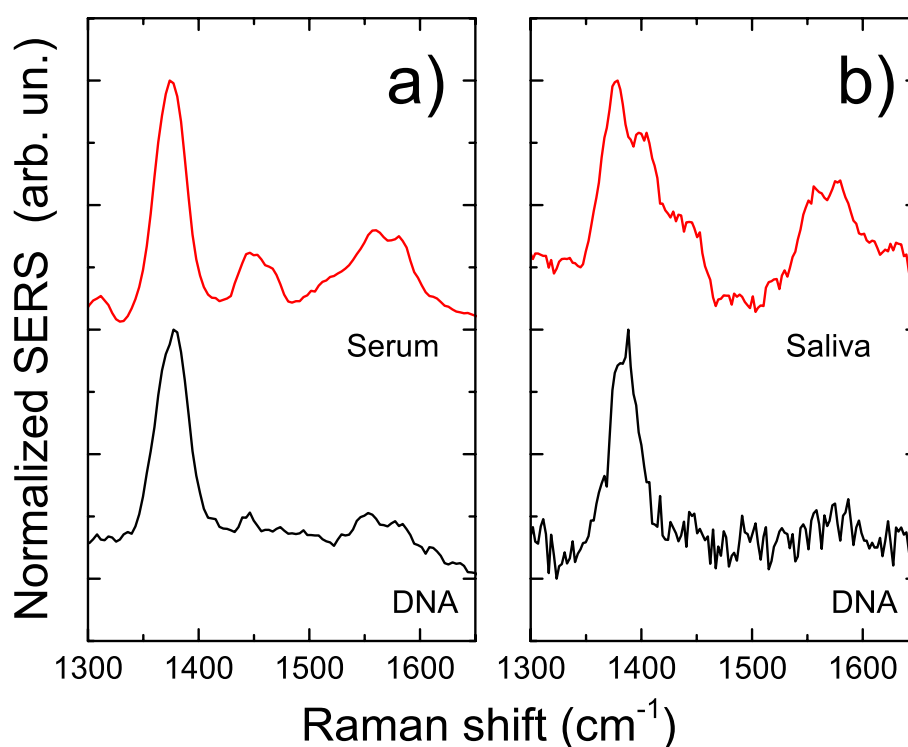


Figure 6: MnSOD detection in body fluids. (a, red line) SERS signal of MnSOD in serum at 10^{-8} M compared that of the aptamer (black line) using gold nanocylinders ($\lambda_{\text{exc}}=660$ nm). (b, red line). Spectrum of MnSOD in saliva at 10^{-8} M compared that of aptamer (black line) on gold nanorods dimers ($\lambda_{\text{exc}}=785$ nm).

Figure 6a shows the SERS signal from one sample of serum (a, red line) using nanocylinders and excitation wavelength at 660 nm and (Figure 6b, red line) from one sample of saliva using nanorod dimers and excitation at 785nm. The black lines in (a, b) represent the reference spectra of the functionalization layer (aptamer and 6-MHO) before the deposition of the body fluids. In the spectra of serum and saliva strongest signal increase is observed in the 1450 - 1650 cm^{-1} band, comparable to what observed with pure MnSOD solutions (Figure 4). One can also notice a slight difference between both spectra since a band located at 1400 cm^{-1} is only observable on the saliva spectrum. However, this band can be assigned to the COO^- stretching (see table SI-1 and figure 3) and is due to the presence of the MnSOD. Such small variations between these spectra can be explained by the protein environment. Indeed, saliva and serum are complex media that can slightly affect the protein structure and as a consequence the SERS signal. These results, together with the specific SERS fingerprint observation on the pure MnSOD solutions and the specificity tests, support the conclusion that our nanobiosensor can detect MnSOD in body fluids at a concentration of 10 nM.

CONCLUSION

We have developed a high sensitivity, high specificity SERS nanobiosensor, that uses EBL optical nanoantennas functionalized with DNA aptamers for specific detection of molecular biomarkers at nanomolar concentrations. Both individual nanocylinders and 20nm gap nanorods dimers have proved the capability to detect MnSOD in pure solutions and, most importantly, in body fluids such as serum and saliva. Our measurements suggest that the use of optimized SERS substrate (e.g. dimers with nm-

gap dimensions, or nanostars) can improve the sensitivity of our sensor and that detection limit lower than the nM can be attained, which is a competitive advantage for the biomarker detection.

ACKNOWLEDGEMENT

Authors acknowledge the European project Nanoantenna (HEALTH-F5-2009-241818) for the financial support. PGG, BF and CD'A acknowledge MIUR (PRIN 2008J858Y7 and PON01_01322 PANREX), RY and MLC acknowledge PIRANEX ANR project (ANR-12-NANO-0016).

REFERENCES

1. Lequin, R. M., Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clinical chemistry* 2005, 51, 2415-2418.
2. Ronkainen, N. J.; Halsall, H. B.; Heineman, W. R., Electrochemical biosensors. *Chemical Society Reviews* 2010, 39, 1747-1763.
3. Ligler, F. S., Perspective on Optical Biosensors and Integrated Sensor Systems. *Analytical Chemistry* 2008, 81, 519-526.
4. Fan, X.; White, I. M.; Shopova, S. I.; Zhu, H.; Suter, J. D.; Sun, Y., Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review. *Analytica Chimica Acta* 2008, 620, 8-26.
5. Borisov, S. M.; Wolfbeis, O. S., Optical biosensors. *Chemical reviews* 2008, 108, 423-461.
6. Ligler, F. S.; Sapsford, K. E.; Golden, J. P.; Shriver-Lake, L. C.; Taitt, C. R.; Dyer, M. A.; Barone, S.; Myatt, C. J., The array biosensor: portable, automated systems. *Analytical sciences : the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry* 2007, 23, 5-10.
7. Taitt, C. R.; Anderson, G. P.; Ligler, F. S., Evanescent wave fluorescence biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* 2005, 20, 2470-2487.
8. Homola, J., Present and future of surface plasmon resonance biosensors. *Anal Bioanal Chem* 2003, 377, 528-539.
9. Arlett, J. L.; Myers, E. B.; Roukes, M. L., Comparative advantages of mechanical biosensors. *Nature nanotechnology* 2011, 6, 203-215.

10. Tamayo, J.; Kosaka, P. M.; Ruz, J. J.; San Paulo, Á.; Calleja, M., Biosensors based on nanomechanical systems. *Chemical Society Reviews* 2013, 42, 1287-1311.
11. O'sullivan, C. K.; Guilbault, G. G., Commercial quartz crystal microbalances—theory and applications. *Biosensors and bioelectronics* 1999, 14, 663-670.
12. Ligler, F. S.; Taitt, C. R.; Shriver-Lake, L. C.; Sapsford, K. E.; Shubin, Y.; Golden, J. P., Array biosensor for detection of toxins. *Anal Bioanal Chem* 2003, 377, 469-77.
13. Jia, K.; Eltzov, E.; Toury, T.; Marks, R. S.; Ionescu, R. E., A lower limit of detection for atrazine was obtained using bioluminescent reporter bacteria via a lower incubation temperature. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2012, 84, 221-226.
14. Garai-Ibabe, G.; Grinyte, R.; Golub, E. I.; Canaan, A.; de la Chapelle, M. L.; Marks, R. S.; Pavlov, V., Label free and amplified detection of cancer marker EBNA-1 by DNA probe based biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* 2011, 30, 272-275.
15. Tombelli, S.; Minunni, M.; Mascini, M., Analytical applications of aptamers. *Biosensors and Bioelectronics* 2005, 20, 2424-2434.
16. Zhang, D.; Xie, Y.; Mrozek, M. F.; Ortiz, C.; Davisson, V. J.; Ben-Amotz, D., Raman detection of proteomic analytes. *Analytical chemistry* 2003, 75, 5703-5709.
17. Fang, Z.; Ge, C.; Zhang, W.; Lie, P.; Zeng, L., A lateral flow biosensor for rapid detection of DNA-binding protein c-jun. *Biosensors and Bioelectronics* 2011, 27, 192-196.
18. Miao, Y.; Cui, T.; Leng, F.; Wilson, W. D., Inhibition of high-mobility-group A2 protein binding to DNA by netropsin: A biosensor-surface plasmon resonance assay. *Analytical Biochemistry* 2008, 374, 7-15.
19. Wu, L.; Zhang, Q.; Su, L.; Huang, M.; Zhao, J.; Yang, M., Effects of small molecular inhibitors on the binding between HIV-1 reverse transcriptase and DNA as revealed by SPR biosensor. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2007, 122, 243-252.
20. Hong, S.-R.; Jeong, H.-D.; Hong, S., QCM DNA biosensor for the diagnosis of a fish pathogenic virus VHSV. *Talanta* 2010, 82, 899-903.
21. Keefe, A. D.; Pai, S.; Ellington, A., Aptamers as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2010, 9, 537-550.
22. Ferraro, J. R., *Introductory raman spectroscopy*. Academic press: 2003.
23. David, C.; d'Andrea, C.; Lancelot, E.; Bochterle, J.; Guillot, N.; Fazio, B.; Maragò, O. M.; Sutton, A.; Charnaux, N.; Neubrech, F., Raman and IR spectroscopy of manganese superoxide dismutase, a pathology biomarker. *Vibrational Spectroscopy* 2012, 62, 50-58.
24. Le Ru, E.; Etchegoin, P., *Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: and related plasmonic effects*. Elsevier: 2008.
25. David, C.; Guillot, N.; Shen, H.; Toury, T.; de la Chapelle, M. L., SERS detection of biomolecules using lithographed nanoparticles towards a reproducible SERS biosensor. *Nanotechnology* 2010, 21, 475501.
26. Hao, E.; Schatz, G. C., Electromagnetic fields around silver nanoparticles and dimers. *The Journal of chemical physics* 2004, 120, 357-366.
27. Fazio, B.; D'Andrea, C.; Bonaccorso, F.; Irrera, A.; Calogero, G.; Vasi, C.; Gucciardi, P. G.; Allegrini, M.; Toma, A.; Chiappe, D., Re-radiation enhancement in polarized surface-enhanced resonant Raman scattering of randomly oriented molecules on self-organized gold nanowires. *ACS Nano* 2011, 5, 5945-5956.
28. Le Ru, E.; Blackie, E.; Meyer, M.; Etchegoin, P. G., Surface enhanced Raman scattering enhancement factors: a comprehensive study. *The Journal of Physical Chemistry C* 2007, 111, 13794-13803.

29. Le Ru, E.; Meyer, M.; Etchegoin, P., Proof of single-molecule sensitivity in surface enhanced Raman scattering (SERS) by means of a two-analyte technique. *The Journal of Physical Chemistry B* 2006, 110, 1944-1948.
30. Le Ru, E. C.; Etchegoin, P. G., Single-molecule surface-enhanced Raman spectroscopy. *Annual review of physical chemistry* 2012, 63, 65-87.
31. Anker, J. N.; Hall, W. P.; Lyandres, O.; Shah, N. C.; Zhao, J.; Van Duyne, R. P., Biosensing with plasmonic nanosensors. *Nature materials* 2008, 7, 442-453.
32. Han, X. X.; Zhao, B.; Ozaki, Y., Surface-enhanced Raman scattering for protein detection. *Anal Bioanal Chem* 2009, 394, 1719-1727.
33. Tripp, R. A.; Dluhy, R. A.; Zhao, Y., Novel nanostructures for SERS biosensing. *Nano Today* 2008, 3, 31-37.
34. Guillot, N.; de la Chapelle, M. L., Lithographed nanostructures as nanosensors. *Journal of Nanophotonics* 2012, 6, 064506-1-064506-28.
35. Bantz, K. C.; Meyer, A. F.; Wittenberg, N. J.; Im, H.; Kurtuluş, Ö.; Lee, S. H.; Lindquist, N. C.; Oh, S.-H.; Haynes, C. L., Recent progress in SERS biosensing. *Physical Chemistry Chemical Physics* 2011, 13, 11551-11567.
36. Douglas, P.; Stokes, R. J.; Graham, D.; Smith, W. E., Immunoassay for P38 MAPK using surface enhanced resonance Raman spectroscopy (SERRS). *Analyst* 2008, 133, 791-796.
37. Stokes, R. J.; McBride, E.; Wilson, C. G.; Girkin, J. M.; Smith, W. E.; Graham, D., Surface-enhanced Raman scattering spectroscopy as a sensitive and selective technique for the detection of folic acid in water and human serum. *Applied spectroscopy* 2008, 62, 371-6.
38. Grubisha, D. S.; Lipert, R. J.; Park, H.-Y.; Driskell, J.; Porter, M. D., Femtomolar detection of prostate-specific antigen: an immunoassay based on surface-enhanced Raman scattering and immunogold labels. *Analytical chemistry* 2003, 75, 5936-5943.
39. Guillot, N.; Shen, H.; Frémaux, B.; Peron, O.; Rinnert, E.; Toury, T.; De La Chapelle, M. L., Surface enhanced Raman scattering optimization of gold nanocylinder arrays: Influence of the localized surface plasmon resonance and excitation wavelength. *Applied Physics Letters* 2010, 97, 023113.
40. McFarland, A. D.; Young, M. A.; Dieringer, J. A.; Van Duyne, R. P., Wavelength-scanned surface-enhanced Raman excitation spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry B* 2005, 109, 11279-11285.
41. D'Andrea, C.; Bochterle, J.; Toma, A.; Huck, C.; Neubrech, F.; Messina, E.; Fazio, B.; Marago, O. M.; Di Fabrizio, E.; Lamy de La Chapelle, M., Optical nanoantennas for multiband surface-enhanced infrared and Raman spectroscopy. *ACS nano* 2013, 7, 3522-3531.
42. Guillot, N.; de la Chapelle, M. L., The electromagnetic effect in surface enhanced Raman scattering: Enhancement optimization using precisely controlled nanostructures. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer* 2012, 113, 2321-2333.
43. Shafer-Peltier, K. E.; Haynes, C. L.; Glucksberg, M. R.; Van Duyne, R. P., Toward a glucose biosensor based on surface-enhanced Raman scattering. *Journal of the American Chemical Society* 2003, 125, 588-593.
44. Stuart, D. A.; Yuen, J. M.; Shah, N.; Lyandres, O.; Yonzon, C. R.; Glucksberg, M. R.; Walsh, J. T.; Van Duyne, R. P., In vivo glucose measurement by surface-enhanced Raman spectroscopy. *Analytical chemistry* 2006, 78, 7211-7215.

45. Zhang, X.; Young, M. A.; Lyandres, O.; Van Duyne, R. P., Rapid detection of an anthrax biomarker by surface-enhanced Raman spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* 2005, 127, 4484-4489.
46. Das, G.; Mecarini, F.; De Angelis, F.; Prasciolu, M.; Liberale, C.; Patrini, M.; Di Fabrizio, E., Attomole (amol) myoglobin Raman detection from plasmonic nanostructures. *Microelectronic Engineering* 2008, 85, 1282-1285.
47. De Angelis, F.; Gentile, F.; Mecarini, F.; Das, G.; Moretti, M.; Candeloro, P.; Coluccio, M.; Cojoc, G.; Accardo, A.; Liberale, C.; Proietti Zaccaria, R.; Perozziello, G.; Tirinato, L.; Toma, A.; Cuda, G.; Cingolani, R.; Di Fabrizio, E., Breaking the diffusion limit with super-hydrophobic delivery of molecules to plasmonic nanofocusing SERS structures. *Nature Photonics* 2011, 5, 682-687.
48. Cho, H.; Baker, B. R.; Wachsmann-Hogiu, S.; Pagba, C. V.; Laurence, T. A.; Lane, S. M.; Lee, L. P.; Tok, J. B.-H., Aptamer-based SERRS sensor for thrombin detection. *Nano letters* 2008, 8, 4386-4390.
49. Li, M.; Zhang, J.; Suri, S.; Sooter, L. J.; Ma, D.; Wu, N., Detection of adenosine triphosphate with an aptamer biosensor based on surface-enhanced Raman scattering. *Analytical chemistry* 2012, 84, 2837-2842.
50. Huh, Y. S.; Erickson, D., Aptamer based surface enhanced Raman scattering detection of vasopressin using multilayer nanotube arrays. *Biosensors and Bioelectronics* 2010, 25, 1240-1243.
51. Lee, H. J.; Li, Y.; Wark, A. W.; Corn, R. M., Enzymatically amplified surface plasmon resonance imaging detection of DNA by exonuclease III digestion of DNA microarrays. *Anal. Chem.* 2005, 77 (16), 5096-5100.
52. Borrelli, A.; Schiattarella, A.; Bonelli, P.; Tuccillo, F. M.; Buonaguro, F. M.; Mancini, A., The Functional Role of MnSOD as a Biomarker of Human Diseases and Therapeutic Potential of a New Isoform of a Human Recombinant MnSOD. *BioMed research international* 2014, 2014.
53. Epperly, M. W.; Defilippi, S.; Sikora, C.; Gretton, J.; Greenberger, J. S., Radioprotection of lung and esophagus by overexpression of the human manganese superoxide dismutase transgene. *Military Medicine* 2002, 167, 71-73.
54. Mukhopadhyay, S.; Das, S. K.; Mukherjee, S., Expression of Mn-Superoxide Dismutase Gene in Nontumorigenic and Tumorigenic Human Mammary Epithelial Cells. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2004, 4, 195-202.
55. Li, J. J.; Oberley, L. W.; St Clair, D. K.; Ridnour, L. A.; Oberley, T. D., Phenotypic changes induced in human breast cancer cells by overexpression of manganese-containing superoxide dismutase. *Oncogene* 1995, 10, 1989-2000.
56. Church, S. L.; Grant, J. W.; Ridnour, L. A.; Oberley, L. W.; Swanson, P. E.; Meltzer, P. S.; Trent, J. M., Increased manganese superoxide dismutase expression suppresses the malignant phenotype of human melanoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1993, 90, 3113-3117.
57. Zhong, W.; Oberley, L. W.; Oberley, T. D.; St Clair, D. K., Suppression of the malignant phenotype of human glioma cells by overexpression of manganese superoxide dismutase. *Oncogene* 1997, 14, 481-90.
58. McGlynn, K. A.; Tarone, R. E.; El-Serag, H. B., A comparison of trends in the incidence of hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2006, 15, 1198-203.
59. Tamai, T.; Uto, H.; Takami, Y.; Oda, K.; Saishoji, A.; Hashiguchi, M.; Kumagai, K.; Kure, T.; Mawatari, S.; Moriuchi, A., *et al.*, Serum manganese

superoxide dismutase and thioredoxin are potential prognostic markers for hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *World journal of gastroenterology : WJG* 2011, 17, 4890-8.

60. Kawaguchi, T.; Suzuki, K.-i.; Matsuda, Y.; Nishiura, T.; Uda, T.; Ono, M.; Sekiya, C.; Ishikawa, M.; Iino, S.; Endo, Y., *et al.*, Serum-manganese-superoxide dismutase: normal values and increased levels in patients with acute myocardial infarction and several malignant diseases determined by an enzyme-linked immunosorbent assay using a monoclonal antibody. *Journal of Immunological Methods* 1990, 127, 249-254.

61. Ishikawa, M.; Yaginuma, Y.; Hayashi, H.; Shimizu, T.; Endo, Y.; Taniguchi, N., Reactivity of a monoclonal antibody to manganese superoxide dismutase with human ovarian carcinoma. *Cancer research* 1990, 50, 2538-42.

62. Schadendorf, D.; Zuberbier, T.; Diehl, S.; Schadendorf, C.; Czarnetzki, B. M., Serum manganese superoxide dismutase is a new tumour marker for malignant melanoma. *Melanoma research* 1995, 5, 351-3.

63. Kessentini, S.; Barchiesi, D.; D'Andrea, C.; Toma, A.; Guillot, N.; Di Fabrizio, E.; Fazio, B.; Maragó, O. M.; Gucciardi, P. G.; Lamy de la Chapelle, M., Gold Dimer Nanoantenna with Slanted Gap for Tunable LSPR and Improved SERS. *The Journal of Physical Chemistry C* 2014, 118, 3209-3219.

64. Mahajan, S.; Cole, R. M.; Speed, J. D.; Pelfrey, S. H.; Russell, A. E.; Bartlett, P. N.; Barnett, S. M.; Baumberg, J. J., Understanding the Surface-Enhanced Raman Spectroscopy "Background" *J. Phys. Chem. C* 2010, 114, 7242 - 7250.

65. Imura, K.; Okamoto, H., Properties of Photoluminescence from Single Gold Nanorods Induced by Near-Field Two-Photon Excitation. *Journal of Physical Chemistry C* 2009, 113, 11756-11759.

66. Gee, A. R.; O'Shea, D. C.; Cummins, H. Z., Raman scattering and fluorescence in calcium fluoride. *Solid State Communications* 1966, 4, 43-46.

67. Pagba, C. V.; Lane, S. M.; Wachsmann-Hogiu, S., Raman and surface-enhanced Raman spectroscopic studies of the 15-mer DNA thrombin-binding aptamer. *Journal of Raman Spectroscopy* 2010, 41, 241-247.

68. Bi, L.; Rao, Y.; Tao, Q.; Dong, J.; Su, T.; Liu, F.; Qian, W., Fabrication of large-scale gold nanoplate films as highly active SERS substrates for label-free DNA detection. *Biosensors and Bioelectronics* 2013, 43, 193-199.

69. Jang, N. H., The coordination chemistry of DNA nucleosides on gold nanoparticles as a probe by SERS. *BULLETIN-KOREAN CHEMICAL SOCIETY* 2002, 23, 1790-1800.

70. Jang, N. H., SERS Analysis of Self-Assembled Monolayers of DNA Strands on Gold Surfaces. *Bulletin of the Korean Chemical Society* 2010, 31, 213-215.

71. Otto, C.; Van den Tweel, T.; De Mul, F.; Greve, J., Surface-enhanced Raman spectroscopy of DNA bases. *Journal of Raman spectroscopy* 1986, 17, 289-298.

72. Duguid, J.; Bloomfield, V. A.; Benevides, J.; Thomas Jr, G. J., Raman spectroscopy of DNA-metal complexes. I. Interactions and conformational effects of the divalent cations: Mg, Ca, Sr, Ba, Mn, Co, Ni, Cu, Pd, and Cd. *Biophysical journal* 1993, 65, 1916-1928.

73. Giese, B.; McNaughton, D., Density functional theoretical (DFT) and surface-enhanced Raman spectroscopic study of guanine and its alkylated derivatives Part 2: Surface-enhanced Raman scattering on silver surfaces. *Physical Chemistry Chemical Physics* 2002, 4, 5171-5182.

74. Rasmussen, A.; Deckert, V., Surface- and tip- enhanced Raman scattering of DNA components. *Journal of Raman Spectroscopy* 2006, 37, 311-317.
75. Marotta, N. E.; Beavers, K. R.; Bottomley, L. A., Limitations of surface enhanced Raman scattering in sensing DNA hybridization demonstrated by label-free DNA oligos as molecular rulers of distance-dependent enhancement. *Analytical chemistry* 2013, 85, 1440-1446.
76. Barhoumi, A.; Zhang, D.; Tam, F.; Halas, N. J., Surface-enhanced Raman spectroscopy of DNA. *Journal of the American Chemical Society* 2008, 130, 5523-5529.
77. Gearheart, L. A.; Ploehn, H. J.; Murphy, C. J., Oligonucleotide Adsorption to Gold Nanoparticles: A Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Study of Intrinsically Bent DNA. *Journal of Physical Chemistry B* 2001, 105, 12609-12615.
78. Muntean, C. M.; Dostál, L.; Misselwitz, R.; Welfle, H., DNA structure at low pH values, in the presence of Mn²⁺ ions: a Raman study. *Journal of Raman Spectroscopy* 2005, 36, 1047-1051.
79. Papadopoulou, E.; Bell, S. E., Label- Free Detection of Single- Base Mismatches in DNA by Surface- Enhanced Raman Spectroscopy. *Angewandte Chemie International Edition* 2011, 50, 9058-9061.
80. Badr, Y.; Mahmoud, M., Effect of silver nanowires on the surface-enhanced Raman spectra (SERS) of the RNA bases. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 2006, 63, 639-645.
81. David, C.; d'Andrea, C.; Lancelot, E.; Bochterle, J.; Guillot, N.; Fazio, B.; Maragò, O. M.; Sutton, A.; Charnaux, N.; Neubrech, F., *et al.*, Raman and IR spectroscopy of manganese superoxide dismutase, a pathology biomarker. *Vibrational Spectroscopy* 2012, 62, 50-58.
82. Park, W.-H.; Kim, Z. H., Charge transfer enhancement in the SERS of a single molecule. *Nano letters* 2010, 10, 4040-4048.

High sensitivity, high selectivity SERS detection of MnSOD using optical nanoantennas functionalized with aptamers.

Maximilien Cottat^{1,§}, Cristiano D'Andrea^{2,§}, Ryohei Yasukuni¹, Natalia Malashikhina³, Ruta Grinyte³, Nathalie Lidgi-Guigui¹, Barbara Fazio², Angela Sutton⁴, Olivier Oudar⁴, Nathalie Charnaux⁴, Valery Pavlov³, Andrea Toma⁵, Enzo Di Fabrizio^{6,7}, Pietro G. Gucciardi², Marc Lamy de la Chapelle^{1,}*

¹ *Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Laboratoire CSPBAT, CNRS, (UMR 7244), 74 rue Marcel Cachin, F-93017 Bobigny, France*

² *CNR IPCF Istituto per i Processi Chimico-Fisici, Viale F. Stagno D'Alcontres 37, I-98156, Messina, Italy*

³ *Biofunctional Nanomaterials Department, CIC biomaGUNE, Parque tecnológico de San Sebastian, Paseo Miramon 182, Donostia- San Sebastian 20009, Spain*

⁴ *Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Bioingénierie cardiovasculaire, INSERM, (U1148), rue Marcel Cachin, 93017, Bobigny, France*

⁵ *Istituto Italiano di Tecnologia. Via Morego 30, 16163 Genova, Italy*

⁶ *KAUST, King Abdullah University of Science and Technology, Physical Science and Engineering and BESE Divisions, Thuwal, 23955 -6900, Kingdom of Saudi Arabia*

⁷ *University of Magna Graecia, BIONEM lab, Campus Salvatore Venuta, Viale Europa 88100 Germaneto-Catanzaro, Italy*

[§] These authors have contributed equally to the work presented in this publication

^{*} Corresponding author : marc.lamydelachapelle@univ-paris13.fr

Supporting information

List of Figures

Figure SI-1: Scheme of the surface functionalization protocol for the selective detection of the detection of MnSOD.

Figure SI-2: Frequency shift measured by QCM in response to different concentrations of MnSOD

Figure SI-3: The SERS spectrum on gold nanorods dimers ($\lambda_{\text{exc}}=785$ nm) after incubation with 6-MOH layer (black line) and MnSOD 10^{-5} M (red line). Spectra are offset vertically for clarity reasons.

Table SI-1: Tentative SERS band assignment based on the peaks positions measured on MnSOD powder by normal Raman.

SI-1: In vitro selection of target-specific aptamers using SELEX technology.

The aptamer of MnSOD were designed using the SELEX process. Starting point of each SELEX process is a synthetic random DNA oligonucleotide library consisting of a multitude of ssDNA fragments with different sequences (10¹⁵). This library is used directly for the selection of DNA aptamers. The SELEX procedure is characterized by the repetition of successive steps consisting of selection (binding, partition, and elution), amplification and conditioning. In the first SELEX round the library and the target molecules are incubated for binding. Unbound oligonucleotides are removed by several stringent washing steps of the binding complexes. The target-bound oligonucleotides are eluted and subsequently amplified by PCR. A new enriched pool of selected oligonucleotides is generated by preparation of the relevant ssDNA from the PCR products. This selected oligonucleotide pool is then used for the next selection round. Nine SELEX rounds were performed for the selection of highly affine, target-specific aptamers. The last SELEX round was finished after the amplification step. The enriched aptamer pool was cloned and several individual aptamers were sequenced¹. Upon determining the DNA sequence, we were able to synthesize several DNA oligonucleotides containing aptamer sequence and $-(T)_{15}$ -SH at 5'-end using the Applied Biosystems DNA synthesizer. Affinity constants of each aptamer immobilized on the surface of gold QCM electrodes were measured as described elsewhere². On the basis of the experimental affinity constants the aptamer with the best affinity to MnSOD was chosen for the following experiments (see SI-3 for more details).

SI-2: Protocol of gold surface functionalisation for QCM experiments

First, the QCM plan gold electrode is cleaned with ozone plasma and rinsed with ethanol to remove any contamination (Figure S-1a). Next, 2.6 μ M of 5'-thiol modified aptamer are immobilized on the gold electrode (Figure S-1b). After washing with the binding buffer, a

frequency change of 42.23 ± 5 Hz, corresponding to a surface coverage of $2.80 \cdot 10^{-11}$ mol/cm², is observed. This coverage is 3.75 times higher than the one obtained with F(ab')₂ fragments immobilization (surface coverage of $7.49 \cdot 10^{-12}$ mol/cm²). The use of aptamers therefore improves the surface coverage and increase the quantity of MnSOD that can be captured on the gold surface. Then, since only partial coverage of the surface by the aptamer is expected, 6-Mercaptohexanol (6-MOH) is used to block the free surface sites in order to prevent non-specific interactions with proteins (Figure S-1c). Finally, solutions containing different concentrations of MnSOD were applied to the electrode surface and the frequency shift was monitored in real time (Figure S-1d).

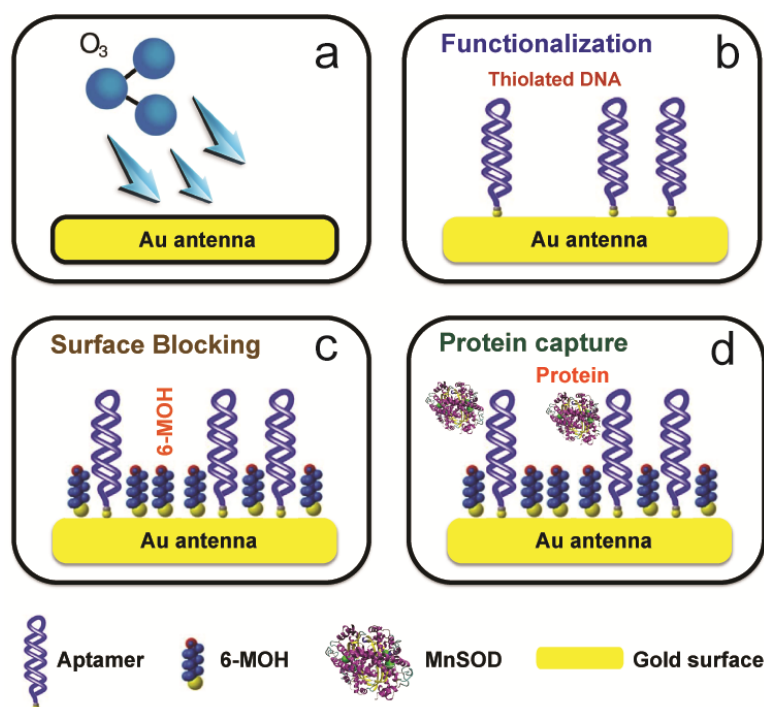


Figure SI-3: Scheme of the surface functionalization protocol for the selective detection of the detection of MnSOD. (a) Surface cleaning by ozone plasma. (b) functionalization with thiolated DNA aptamer. (c) Blocking of the surface active sites non covered by the aptamer with 6-mercaptohexanol. (d) Selective capture of the protein. The same protocol is used for the plan gold electrode of the QCM and the gold nanoantennas.

SI-3: determination of the dissociation constant of the aptamer by QCM experiments

As shown in Figure SI-4, when the MnSOD concentration increases from 50 nM to 1200 nM, we observe a frequency shift ($-\Delta Hz$) varying from 1.9 ± 0.2 Hz to 9 ± 1 Hz, due to the specific binding between MnSOD and the aptamer. The shift increases nearly linearly from 50 nM to 400 nM, and reaches a plateau for higher concentrations (due to saturation of the surface). A non-linear regression function (Program GraFit7) based on the Langmuir adsorption isotherm model (Equation 1) has been used to fit the dependence of the frequency shift with the MnSOD concentration.²

$$\frac{[MnSOD]}{-\Delta f_{MnSOD}} = \frac{K_D}{-\Delta f_{max}} + \frac{[MnSOD]}{-\Delta f_{max}} \quad (1)$$

Nonlinear regression fitting of the experimental data by the equation 1 gave the values of dissociation constant (K_D) and maximum change in resonator frequency (ΔHz_{max}) at infinitely high concentration of MnSOD. According to this calculation the dissociation constant, K_D , between MnSOD and immobilized aptamer was found to be 313 ± 57 nM. Such K_D value means that the affinity between the aptamer and the MnSOD is strong and the binding with the DNA probe very selective. To determine the specificity of the aptamer, control experiments have been performed on gold electrodes modified only with 6-MOH, without aptamer. In this case, no frequency shift is measured confirming that in absence of the specific aptamer, no MnSOD adsorbed by the 6-MOH.

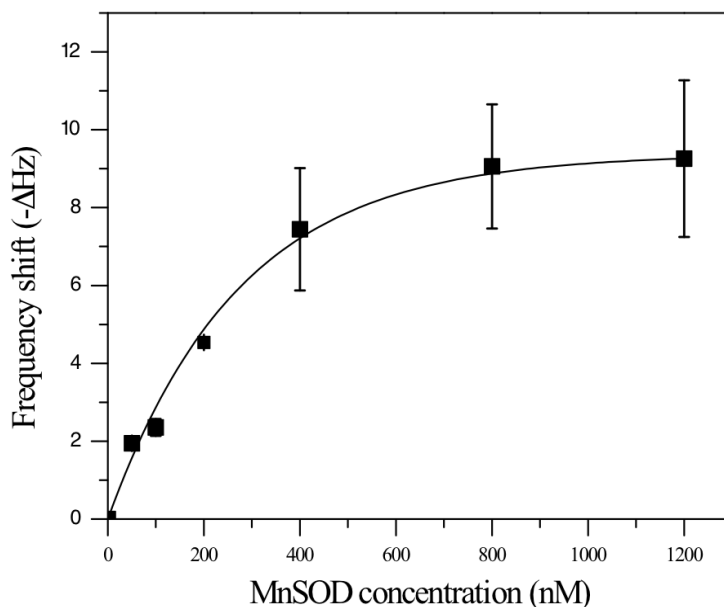


Figure SI-4: Frequency shift measured by QCM in response to different concentrations of MnSOD, from 50 nM to 1200 nM. The error bars represent the standard deviation of three measurements.

SI-4: Protocol of gold nanoantenna surface functionalisation for SERS experiments

First, nanoantennas are cleaned by ozone plasma ashing. Then, the aptamers (120 ng/ μ l) are dissolved in a binding buffer (1 M KCl) and a drop of aptamer solution (10 μ l) is deposited on the nanoantennas surface. Incubation is carried out for 1h at room temperature, preserving the humidity of the environment around the sample to avoid drying of the solution that would yield the typical coffee ring effect, and consequent inhomogeneous distribution of the solutes. The surface is subsequently rinsed with water to remove the aptamers in excess and dried under nitrogen flow. Next, surface blocking of the free sites is carried out depositing a drop of 6-MOH (2 mM in ethanol) on the surface, incubated at room temperature for 1h, washed with ethanol and dried under nitrogen flow.

SI-5: Negative control experiment: interaction between the blocking layer (6-MOH) and the MnSOD protein

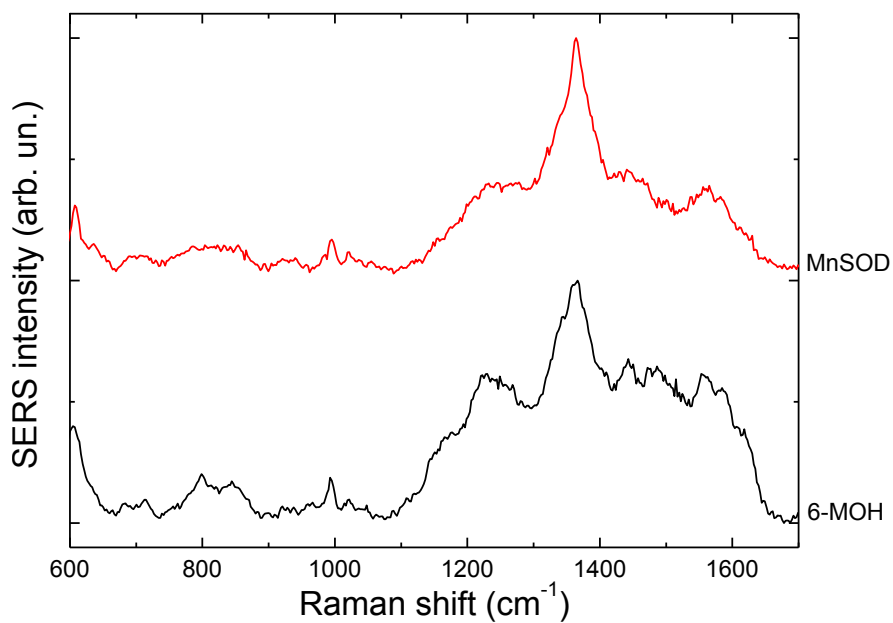


Figure SI-3: The SERS spectrum on gold nanorods dimers ($\lambda_{\text{exc}}=785$ nm) after incubation with 6-MOH layer (black line) and MnSOD 10^{-5} M (red line). Spectra are offset vertically for clarity reasons.

Table SI-2: Tentative SERS band assignment based on the peaks positions measured on MnSOD powder by normal Raman.

SERS of MnSOD (this work)	Raman of MnSOD (Ref. [3])	Tentative mode assignment
Peak position (cm ⁻¹)		
671	662	CS stretching
750	-	Not assigned
910	909	Aliphatic C-C stretching
1098	1092	Non aromatic CN stretching
1141,1150	1150	Aliphatic side chain CH ₃ bending
1242, 1250, 1283	1241, 1250, 1298	Amide III
1311	1311	Not assigned
1350	1363	CH ₂ bending
1417	1411	COO ⁻ stretching
1460	1451	CH ₂ non-aromatic bending
1536	-	Amide II
1605	1600	Phe ring stretching
1620, 1647	1652, 1670	Amide I

1. Stoltenburg, R.; Reinemann, C.; Strehlitz, B.; SELEX—A (r)evolutionary method to generate highaffinity nucleic acid ligands, *Biomolecular Engineering*, 2007, 24, 381-403
2. Garai-Ibabe, G.; Grinyte, R.; Golub, E. I.; Canaan, A.; de la Chapelle, M. L.; Marks, R. S.; Pavlov, V., Label free and amplified detection of cancer marker EBNA-1 by DNA probe based biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* 2011, 30, 272-275.
3. David, C.; d'Andrea, C.; Lancelot, E.; Bochterle, J.; Guillot, N.; Fazio, B.; Maragò, O. M.; Sutton, A.; Charnaux, N.; Neubrech, F., *et al.*, Raman and IR spectroscopy of manganese superoxide dismutase, a pathology biomarker. *Vibrational Spectroscopy* 2012, 62, 50-58.

VI. 4 Etude de l'influence de la phosphorylation sur la structure de la protéine Syk

Le développement de nos deux biocapteurs démontre la possibilité de combiner la diffusion Raman exaltée de surface avec la lithographie par nanoimpression UV ou avec la lithographie électronique, pour une détection sensible, reproductible et spécifique d'une protéine. Ces biocapteurs, efficaces dans la détection de protéines dans des tampons simples, peuvent aussi l'être dans la détection de biomarqueurs dans des milieux physiologiques plus complexes. Cependant, ces biocapteurs ne permettent pas une étude structurale des protéines d'intérêt malgré l'utilisation de l'approche DRES qui est connue pour être performante dans la caractérisation des structures protéiques [130, 137]. Il a également été démontré que cette technique permet l'observation de changements structuraux de protéines suite à des modifications post-traductionnelles [134,187]. Les modifications post-traductionnelles sont notamment essentielles à l'activité de certaines protéines. Dans les cellules B par exemple, le niveau de phosphorylation de la protéine Syk joue un rôle déterminant dans sa fonction de propagation du signal du récepteur des cellules B (BCR) [188].

Pour aller au delà de la simple détection des protéines, nous nous sommes donc également intéressés à l'analyse de la structure de Syk par DRES grâce à l'utilisation de nanocylindres fabriqués par lithographie électronique. Deux formes de la protéine ont été étudiées, une forme non phosphorylée et une forme phosphorylée. Les niveaux de phosphorylation et d'activité kinase des deux formes de la protéine ont été mesurés par Western Blot (WB). Nos résultats montrent que Syk, non-phosphorylée est inactive, alors que Syk phosphorylée s'auto-phosphoryle et est donc active. Une analyse des spectres DRES révèle des signatures spectrales différentes. L'étude des bandes amides, ainsi que des bandes caractéristiques de certains acides aminés comme les aromatiques, tend à démontrer que la structure de Syk varie en fonction de son état de phosphorylation. A l'aide de la structure atomique de Syk [124], nous proposons un modèle dans lequel Syk interagit différemment avec les nanoparticules d'or en fonction de son état de phosphorylation. Ces résultats établissent un lien entre la fonction de Syk et sa structure *via* sa phosphorylation.

Article 7

Syk conformational analysis by Surface Enhanced Raman Spectroscopy

Maximilien Cottat, Nathalie Lidgi-Guigui, Nadine Varin-Blank, Marc Lamy de la Chapelle, Christine Le Roy

en rédaction

Syk conformational analysis by Surface Enhanced Raman Spectroscopy

Maximilien Cottat^{a,b}, Nathalie Lidgi-Guigui^a, Nadine Varin-Blank^b, Marc Lamy de la Chapelle^{a*} and Christine Le Roy^{b*}

* Co-senior authors

^a *Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Laboratoire CSPBAT, CNRS, (UMR 7244), 74 rue Marcel Cachin, 93017 Bobigny, France*

^b *Laboratoire UMR 978, INSERM-Université Paris 13, Labex Inflamex, PRES Sorbonne Paris-Cité, UFR-SMBH, 74 rue Marcel Cachin, 93017 Bobigny, France*

Phosphorylation modifications of proteins are crucial for their functions¹ by inducing local and global variations of their structures^{2,3}. The latter are usually characterized by using X-ray diffraction⁴. Despite its informative atomic resolution, this crystal-based methodology is destructive, multi-step and time-consuming. To overcome these constraints and to determine the phosphorylation-dependent protein conformational changes, we developed an approach based on the Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) in aqueous condition. We choose to work with the Spleen Tyrosine Kinase (Syk) protein, which was described to be trans- and/or auto-phosphorylated to become functionally activated upon immune receptor activation⁵⁻⁹. The current model proposes that phosphorylation-dependent Syk activity is linked to its phosphorylation-mediated conformational changes. Despite the conformational rearrangements upon Syk auto-phosphorylation found by single particle microscopy¹⁰, no other technical approach was available to study the influence of phosphorylation on Syk global conformation change. In this study, we showed that the phosphorylation levels of a recombinant human Syk protein, especially on specific tyrosine residues, were linked to its kinase activity that was measured by its auto-phosphorylation levels. After loading the un-phosphorylated and phosphorylated forms of Syk in aqueous solution on electron beam lithography-made gold nanocylinders, our SERS analysis led to two distinct spectra, suggesting that Syk global conformation varies with its phosphorylation status. Peak assignments of both Syk spectra helped with a Syk atomic structure model¹¹ analysis allowed us to identify specific Syk sequences in contact with the gold nanoparticles of both Syk forms. Based on these data, we proposed a model for Syk conformational changes depending on its phosphorylation state that is linked to its function. Altogether, SERS is a powerful approach

in establishing the connection between the global structure and the function of post-translational modified proteins. So, this SERS approach might represent an interesting tool to identify novel structural biomarkers in pathophysiological systems.

In order to determine the Syk structure rearrangements based on its phosphorylation levels, we used a wild type form of Syk (Syk WT) expressed in bacteria, a phosphorylated wild type form of Syk (Syk P) expressed in insect cells and a dephosphorylated wild type form of Syk (Syk dP), which was generated by incubating Syk P with the CIP phosphatase. The phosphorylation status and kinase activity of Syk forms were determined by western blotting (WB). As revealed by WB using an anti-phosphotyrosine antibody (Figure 1A), only Syk P was detected (top blot) despite the presence of all Syk forms (bottom blot hybridized with an anti-Syk antibody). In agreement with published data¹⁰, the absence of phosphorylated form of Syk WT demonstrated that this protein was not post-translationally modified by phosphorylation in bacteria but was in insect cells. The signal obtained with the anti-phosphotyrosine antibody for the Syk P form was strongly decreased in presence of CIP enzyme demonstrating that the phosphorylated form of Syk P was well dephosphorylated *in vitro* (Syk dP) after the phosphatase treatment. To investigate whether Syk P was modified on specific tyrosine residues (Y) that are required for its activity⁹, we investigated its levels of phospho-Y323, -Y348 and -Y525 before and after treatment with the CIP phosphatase. Figure 1B showed that these three tyrosine residues were phosphorylated in absence of CIP, suggesting that this Syk P form is functional. After incubating it with CIP, the signals of phospho-Y323, Y352 and Y525 strongly diminished, indicating that the Syk dP form was inactive. To confirm the link between the phosphorylated levels of Syk forms and their kinase activity, we measured the phosphotyrosine levels of Syk WT and Syk P in a kinase activity assay (- and + ATP) by WB. As shown in Figure 1C, no signal was observed with Syk WT in absence or presence of ATP, whereas the basal phospho-signal was increased in presence of ATP with the Syk P form. These data demonstrated that the Syk WT form was not phosphorylated and inactive whereas Syk P was phosphorylated and active.

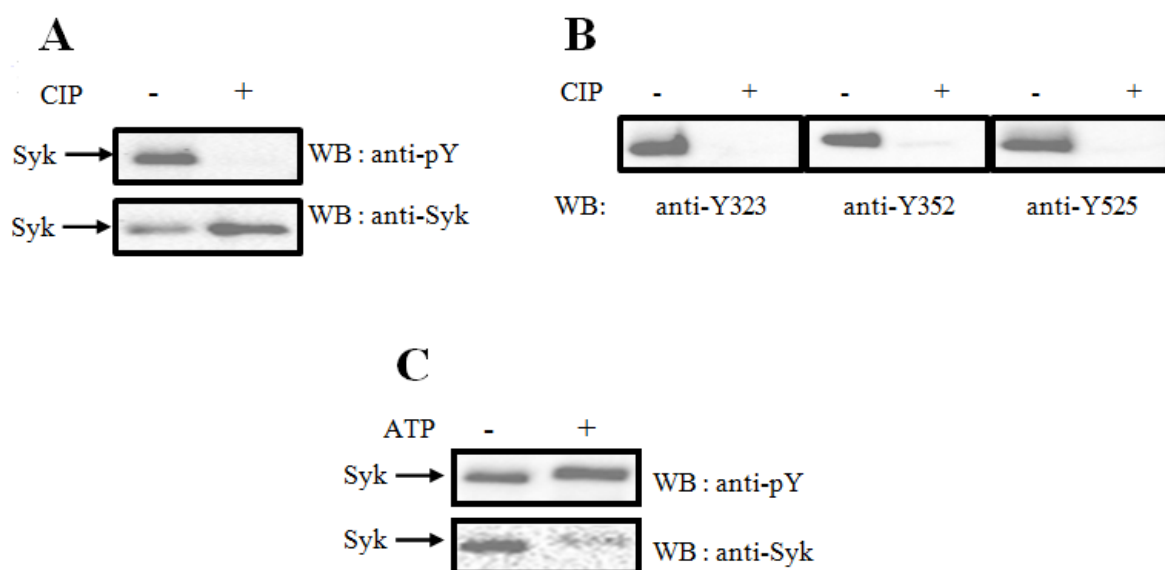


Figure 1: A) tyrosine phosphorylation levels of Syk WT and Syk P forms, B) specific phospho-tyrosine residue levels of the Syk P form before and after phosphatase treatment, C) auto-phosphorylation activity in absence or presence of ATP of the Syk WT and Syk P forms.

SERS is a powerful technique for characterizing protein structures^{12,13} and detecting tyrosine phosphorylation on peptides and proteins in aqueous buffers and physiological fluids¹⁴⁻¹⁶. To determine the impact of the phosphorylation on Syk structure, the different Syk forms (WT, dP and P) were analyzed by SERS in aqueous solutions. SERS spectra of the Syk dP (1) and Syk P (2) are presented on Figure 2 and Syk WT SERS spectrum on Extended data Figure 1. Spectra for each Syk form represent the average spectral signature of at least five SERS signals generated on several locations of the gold nanostructures. Global comparison of these signatures revealed that Syk P and Syk dP were different whereas Syk dP and Syk WT were quite similar, suggesting that the Syk phosphorylation state was playing a role in the Syk spectral signal.

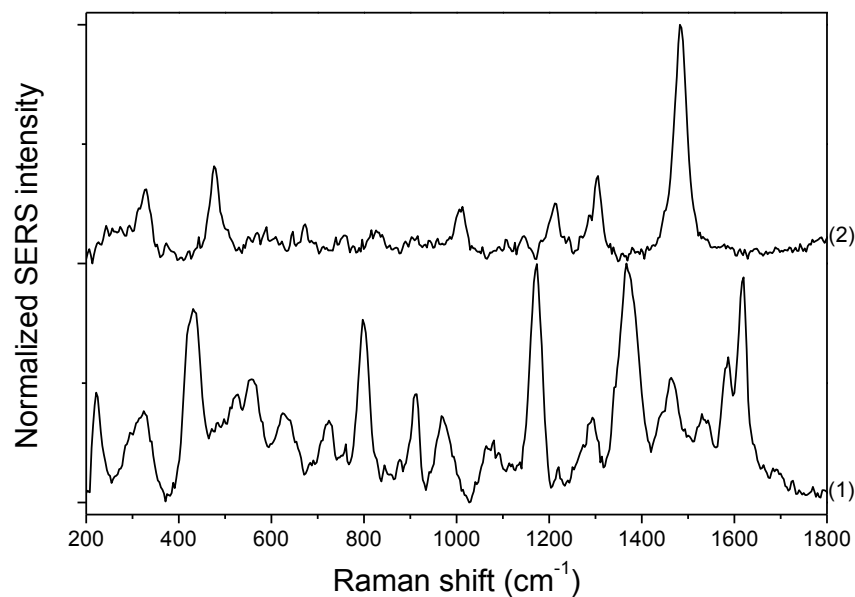


Figure 2: SERS spectra of dephosphorylated Syk (Syk dP) (1) and phosphorylated Syk (Syk P) (2).

To determine the Syk structure adsorbed on the gold nanostructures, all spectra were analyzed and revealed the presence of amino acid peaks and amide bands^{12,14,15,17-24} (table 1).

Peaks position		Tentative of Assignment
Syk dP	Syk P	
221		$\nu(\text{S-Au})$
294		
324	327	
421		$\nu(\text{C-S})$
439		Tyr
	475	
485	485	
525	505	$\nu(\text{S-S})$
558	551	
	567	Trp
582	587	
603		Phe
	611	
622		$\nu(\text{C-S})$
639	645	Tyr
655		
	670	$\nu(\text{C-S})$
684		
704	691	$\nu(\text{C-S})$
723		
755	755	Trp
798		Tyr
815	813	
825		

850 877	835	
894		Trp
910	907	$\nu(\text{C-C})$
968	958	Trp/Val
983		Trp
993 1004	997 1005	Phe (ring stretching)
	1014	Trp
1062 1077 1121	1107	Non aromatic $\nu(\text{C-N})$ and $\nu(\text{C-C})$
1172	1144 1201	Phe, Tyr
1219	1214	Tyr, Phe
1250	1237	Amide III (β -sheet)
1271 1284 1295	1269 1283	Amide III (α -helix)
1307 1326 1340 1352 1366 1377 1387	1303	Non aromatic $\delta(\text{CH}_2)$, or Trp (inodole ring)
1397		$\nu(\text{COO}^-)$
1439 1462	1450	$\delta(\text{CH}_2)$
1476	1483	Non aromatic $\delta(\text{CH}_2)$
1499		
1520	1511	
1541		Amide II ($\delta(\text{N-H})$)
1584		Trp (ring stretching)
1606		Phe (ring stretching)
1619		Tyr, Phe, Trp (ring stretching)
1643		Amide I (α -helix)

Table 1: SERS band assignment for Syk P and Syk dP forms

Interestingly, we noticed the presence of a peak at 221 cm^{-1} that is typical of the vibration S-Au²⁵. This indicated that a thiol group (SH) of Syk, which is present in cysteine residue, was bound to the gold surface. Based on the atomic structure of complete Syk¹¹, we noted three cysteine residues (Cys101, Cys593, Cys597) available for gold interaction (extended data Figure 2). On spectrum (1), peaks at 421 cm^{-1} , 622 cm^{-1} , 704 cm^{-1} and at 723 cm^{-1} , which correspond to C-S stretching vibration^{15,17,19,25}, were very intense and significant of the cysteine residue presence at the gold surface vicinity. In addition, band specific of disulfide

(S-S) bonds, which are formed by two closed cysteine residues, was substantial in the region 500-560 cm^{-1} , meaning that this bond was also close to the surface of the nanostructures^{12,21}. Based on these observations, we proposed a model where Syk interacts with the surface through its Cys101, whereas the disulfide bond between Cys593-Cys597 was close to the surface. Moreover, the presence of the disulfide bond suggested that Syk was not structurally altered by its binding to the gold nanoparticles²⁶. However, the amide I band (1630-1680 cm^{-1} : α -helix: 1630-1650 cm^{-1} , random: 1650-1665 cm^{-1} and β -sheet: 1665-1680 cm^{-1})^{12,18,21}, which is characteristic of the protein secondary structure, was very weak or undetectable. This might be explained by two main reasons. First, the proteins had a specific interaction with the nanoparticles and in this region, the α -helix and β -sheet were not enough close to the surface to provide the amide I signal. Second, the presence of high peaks at 755 cm^{-1} , 877 cm^{-1} , 983 cm^{-1} , 1172 cm^{-1} , 1584 cm^{-1} and 1619 cm^{-1} indicated a large amount of tryptophan (Trp, W), phenylalanine (Phe, F) and tyrosine (Tyr) residues in the interacting region comprising the disulfide bond. Close to the surface, these aromatic amino acids emitted a strong signal¹², as observed in spectrum (1). Their presence was confirmed by a detailed analysis of the atomic structure of Syk¹¹ (Extended data Figure 3). So, the absence of the amide I signal, which might be covered by the strong peak at 1619 cm^{-1} , might be explained by the two previous points²⁷. Concerning the amide III band, which is also sensitive to the secondary structure, its position is located in the region 1230-1300 cm^{-1} (1230-1250 cm^{-1} : β -sheet, 1250-1265 cm^{-1} : random, 1265-1300 cm^{-1} : α -helix)^{15,19}. Because other vibrational modes exist in the same region^{15,18}, it is difficult to use the amide III to extract the right composition in α -helix and β -sheet. Nevertheless, the presence of bands in the α -helix region (1271, 1284 and 1295 cm^{-1}) and in a β -sheet strand (1250 cm^{-1}) in the Syk dP spectrum was confirmed around the Cys593-Cys597 (Extended data Figure 3). Also, the band at 1541 cm^{-1} , which is characteristic of the amide II band^{12,15,24} and sensitive to the β turns, was noticeable in the region around Cys101 (Extended data Figure 2). Altogether, SERS spectrum (1) data supported the unphosphorylated Syk WT atomic structure by demonstrating that this Syk form interacted with the gold surface through its N-t SH2 (Figure 3) without losing its conformation.

Syk P SERS signal (spectrum (2) showed in Figure 2) had a different spectral signature as compared to the Syk dP or Syk WT ones. Knowing that Syk auto-kinase activity consists mainly on tyrosine residue phosphorylation, we focused on peaks assigned to specific Tyr doublet (Fermi resonance between the overtone of an out-of-plane ring bending and the ring breathing vibrations). Its frequency varied between 825 and 850 cm^{-1} in spectrum (1),

whereas it was a single peak at 835 cm^{-1} in spectrum (2), that is characteristic of phosphorylation¹⁴. Also, phosphorylation modification is known to affect the intensity of the amide band as well as the Tyr vibrational modes^{14,15}. In the Syk P form, we noticed a strong decrease in the intensity of the amide III band and Tyr peaks. Furthermore, some peaks of amide III band were down shifted (1250 cm^{-1} to 1237 cm^{-1}) or disappeared (1295 cm^{-1}). This behavior was due to the replacement of the light hydrogen atom by the heavy phosphate group. Accordingly, the protein structure changed with its phosphorylation and varied its interaction to the gold nanostructures. The new interaction is confirmed by the presence of C-S and S-S vibrations in Syk dP spectrum, that decreased dramatically in Syk P signature. However, a band at 670 cm^{-1} , which also corresponds to C-S stretching²⁸, was revealed. Even if intense peaks at 1584 and 1619 cm^{-1} vanished, bands at 755 , 813 and 1014 cm^{-1} that are all assigned to Trp and/or Tyr^{12,15,21} were still part of the spectrum. Additionally, the band at 1172 cm^{-1} , which is assigned to Phe and Tyr residues, was shifted to 1201 cm^{-1} . The peak intensity at 1005 cm^{-1} is sensitive to the orientation of the Phe ring^{12,15}. In case of Syk P, its intensity was stronger as compared to Syk WT or Syk dP, suggesting that phosphorylation allowed different orientations of Phe residues. Moreover, we noted the strong intensity of the peak at 1483 cm^{-1} that was dependent on the CH_2 bending of non-aromatic amino acid¹⁹. The amide II band was also missing with turns that are usually located right after structured domains. Altogether, these observations (lower signal for C-S and S-S bands, less amount of Trp and Tyr, amide III shifted, high signal of non aromatic CH_2 vibration) led us to propose another model for the Syk phosphorylated form interacting with the gold surface (Figure 3). First, the region of Syk binding to the nanostructures contained an unstructured part with few aromatic amino acids. Second, the lack of peaks around 220 cm^{-1} indicated the absence of link between the gold surface and the cysteine residues of the protein, suggesting that Syk P was only absorbed on the surface. All these requirements were found in the sequence of the inter-domain B and close to the Cys 259 residues (Extended data Figure 4). Our model showed that Syk WT and Syk P did not have the same orientation on the gold surface.

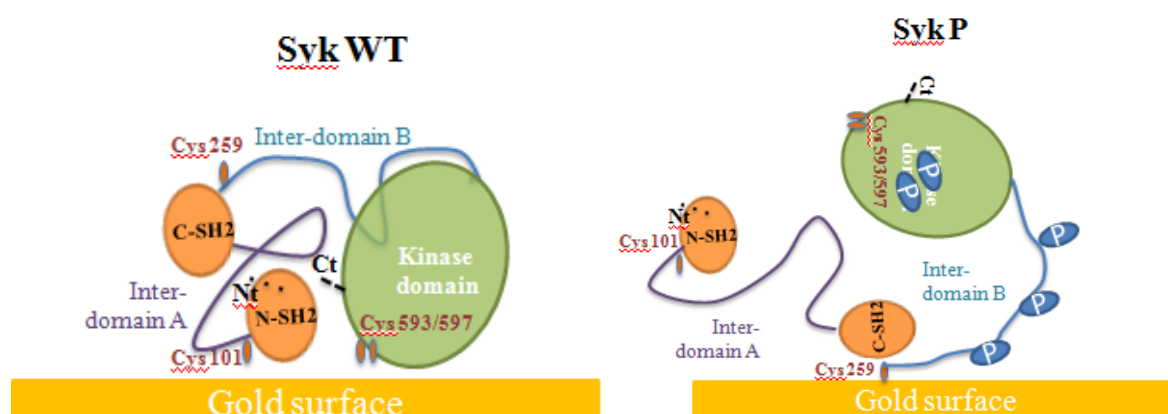


Figure 3: model of unphosphorylated and phosphorylated Syk structures bound to gold nanoparticles. The Syk protein consists of two adjacent src homology 2 (SH2) domains separated from the C-terminal kinase domain by a linker region.

By studying the different Syk forms by WB and SERS, this work allowed us to conclude that the Syk phosphorylation status was linked to its activity and associated with its structure. In combination with the data of the atomic structure resolution, SERS spectrum analysis is a powerful tool to determine changes in protein conformations and then to model them.

Acknowledgments

This work was supported by the Nanoantenna European project (FP7-HEALTH-F5-2009 241818), the “Bonus Qualité Recherche de Projets Scientifiques Interdisciplinaires” of the University Paris 13 and the Ecole Doctorale Galilée of the University Paris 13, France.

Materials and methods

Protein expression

The un-phosphorylated wild type Syk recombinant protein (Syk WT) was produced in BL21 bacteria (Invitrogen) and purified with the magnetic Nickel beads (Millipore). The phosphorylated Syk form (Syk P) was produced in baculovirus infected Sf9 cells and purified

(Active Motif). After purification, both proteins were concentrated using columns with a cut-off at 30 kDa (Millipore).

Auto-phosphorylation kinase assay

Syk WT and Syk P were incubated in a buffer containing 50 mM Tris-HCl, 25 mM MgCl₂, 10 mM NaVO₃, 1 mM DTT, supplemented with 100 mM ATP (Sigma). After 1h at RT, the reaction was stopped by cooling down the tube on ice. Then, the unphosphorylated and phosphorylated forms were then separated on SDS-PAGE gel, transferred into nitrocellulose membrane that were incubated with monoclonal mouse anti-phosphotyrosine antibody (Millipore) followed by a secondary antibody coupled to HRP enzyme (BioRad) before revelation with the ECL kit (Pierce).

Dephosphorylation test

Syk P was incubated in absence or in presence of 1 µl of CIP in a buffer containing 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ and 1 mM DTT. After 1h incubation at 37°C, proteins were processed as described in the auto-phosphorylation kinase assay.

SERS samples

Gold nanocylinders of 130 nm diameter were made by electron-beam lithography (EBL) on glass substrates. A chromium adhesion layer of 3 nm was deposited before evaporate 50 nm of gold. Distance between nanocylinders is 200 nm in both directions.

SERS experiment

SERS experiments were performed in liquid environment. Substrates were immersed in PBS in an up-side down configuration. SERS spectra were recorded using an Xplora spectrometer, from Jobin-Yvon. A grating of 600 lines mm⁻¹ with a slit of 100 µm gives a resolution of 3 cm⁻¹. An objective of x60 with a numerical aperture of 0.6 was used. Proteins were

illuminated with the 660 nm wavelength and the laser power was less than 1 mW at the sample. SERS spectra were acquired during 60 s, twice to increase signal/noise ratio.

References

- 1 Nishi, H., Shaytan, A. & Panchenko, A. R. Physicochemical mechanisms of protein regulation by phosphorylation. *Frontiers in Genetics* **5**, doi:10.3389/fgene.2014.00270 (2014).
- 2 Xin, F. X. & Radivojac, P. Post-translational modifications induce significant yet not extreme changes to protein structure. *Bioinformatics* **28**, 2905-2913, doi:10.1093/bioinformatics/bts541 (2012).
- 3 Groban, E. S., Narayanan, A. & Jacobson, M. P. Conformational Changes in Protein Loops and Helices Induced by Post-Translational Phosphorylation. *PLoS Comput Biol* **2**, e32, doi:10.1371/journal.pcbi.0020032 (2006).
- 4 Hubbard, S. R. *Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog*. Vol. 16 (1997).
- 5 Kurosaki, T. & Hikida, M. Tyrosine kinases and their substrates in B lymphocytes. *Immunological Reviews* **228**, 132-148, doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00748.x (2009).
- 6 de Castro, R. O. Regulation and Function of Syk Tyrosine Kinase in Mast Cell Signaling and Beyond. *Journal of Signal Transduction* **2011**, doi:10.1155/2011/507291 (2011).
- 7 Mócsai, A., Ruland, J. & Tybulewicz, V. L. J. The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nat Rev Immunol* **10**, 387-402 (2010).
- 8 Furlong, M. T. *et al.* Identification of the major sites of autophosphorylation of the murine protein-tyrosine kinase Syk. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1355**, 177-190, doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0167-4889(96)00131-0 (1997).
- 9 Bohnenberger, H. *et al.* Complex phosphorylation dynamics control the composition of the Syk interactome in B cells. *European Journal of Immunology* **41**, 1550-1562, doi:10.1002/eji.201041326 (2011).
- 10 Arias-Palomo, E., Recuero-Checa, M. A., Bustelo, X. R. & Llorca, O. Conformational rearrangements upon Syk auto-phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **1794**, 1211-1217, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.04.010 (2009).
- 11 Grädler, U. *et al.* Structural and Biophysical Characterization of the Syk Activation Switch. *Journal of Molecular Biology* **425**, 309-333, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2012.11.007 (2013).
- 12 Hu, J., Sheng, R. S., Xu, Z. S. & Zeng, Y. e. Surface enhanced Raman spectroscopy of lysozyme. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **51**, 1087-1096, doi:http://dx.doi.org/10.1016/0584-8539(94)00225-Z (1995).
- 13 Han, X. X., Huang, G. G., Zhao, B. & Ozaki, Y. Label-Free Highly Sensitive Detection of Proteins in Aqueous Solutions Using Surface-Enhanced Raman Scattering. *Analytical Chemistry* **81**, 3329-3333, doi:10.1021/ac900395x (2009).
- 14 Moger, J., Gribbon, P., Sewing, A. & Winlove, C. P. Feasibility study using surface-enhanced Raman spectroscopy for the quantitative detection of tyrosine and serine phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1770**, 912-918, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2007.01.018 (2007).
- 15 Siddhanta, S., Karthigeyan, D., Kundu, P. P., Kundu, T. K. & Narayana, C. Surface enhanced Raman spectroscopy of Aurora kinases: direct, ultrasensitive detection of autophosphorylation. *RSC Advances* **3**, 4221-4230, doi:10.1039/c3ra22676j (2013).
- 16 Domenici, F., Bizzarri, A. R. & Cannistraro, S. Surface-enhanced Raman scattering detection of wild-type and mutant p53 proteins at very low concentration in human serum. *Analytical Biochemistry* **421**, 9-15, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2011.10.010 (2012).
- 17 Das, G. *et al.* Principal component analysis based methodology to distinguish protein SERS spectra. *Journal of Molecular Structure* **993**, 500-505, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2010.12.044 (2011).
- 18 Maiti, N. C., Apetri, M. M., Zagorski, M. G., Carey, P. R. & Anderson, V. E. Raman Spectroscopic Characterization of Secondary Structure in Natively Unfolded Proteins: α -Synuclein. *Journal of the American Chemical Society* **126**, 2399-2408, doi:10.1021/ja0356176 (2004).

- 19 David, C. *et al.* Raman and IR spectroscopy of manganese superoxide dismutase, a pathology biomarker. *Vibrational Spectroscopy* **62**, 50-58, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.vibspec.2012.06.003 (2012).
- 20 Rygula, A. *et al.* Raman spectroscopy of proteins: a review. *Journal of Raman Spectroscopy* **44**, 1061-1076, doi:10.1002/jrs.4335 (2013).
- 21 Podstawka, E., Ozaki, Y. & Proniewicz, L. M. Adsorption of S-S containing proteins on a colloidal silver surface studied by surface-enhanced Raman spectroscopy. *Applied spectroscopy* **58**, 1147-1156, doi:10.1366/0003702042336073 (2004).
- 22 Stewart, S. & Fredericks, P. M. Surface-enhanced Raman spectroscopy of peptides and proteins adsorbed on an electrochemically prepared silver surface. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **55**, 1615-1640, doi:http://dx.doi.org/10.1016/S1386-1425(98)00293-5 (1999).
- 23 Ellepola, S. W., Choi, S. M., Phillips, D. L. & Ma, C. Y. Raman spectroscopic study of rice globulin. *Journal of Cereal Science* **43**, 85-93, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2005.06.006 (2006).
- 24 Schweitzer-Stenner, R. Advances in vibrational spectroscopy as a sensitive probe of peptide and protein structure - A critical review. *Vibrational Spectroscopy* **42**, 98-117, doi:10.1016/j.vibspec.2006.01.004 (2006).
- 25 Hassan, N. & Holze, R. Surface enhanced Raman spectroscopy of self-assembled monolayers of 2-mercaptopyridine on a gold electrode. *Russ J Electrochem* **48**, 401-411, doi:10.1134/s1023193512030056 (2012).
- 26 Iosin, M., Toderas, F., Baldeck, P. L. & Astilean, S. Study of protein-gold nanoparticle conjugates by fluorescence and surface-enhanced Raman scattering. *Journal of Molecular Structure* **924-926**, 196-200, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2009.02.004 (2009).
- 27 Kurouski, D., Postiglione, T., Deckert-Gaudig, T., Deckert, V. & Lednev, I. K. Amide I vibrational mode suppression in surface (SERS) and tip (TERS) enhanced Raman spectra of protein specimens. *Analyst* **138**, 1665-1673, doi:10.1039/c2an36478f (2013).
- 28 Jing, C. & Fang, Y. Experimental (SERS) and theoretical (DFT) studies on the adsorption behaviors of l-cysteine on gold/silver nanoparticles. *Chemical Physics* **332**, 27-32, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.chemphys.2006.11.019 (2007).

Extended data:

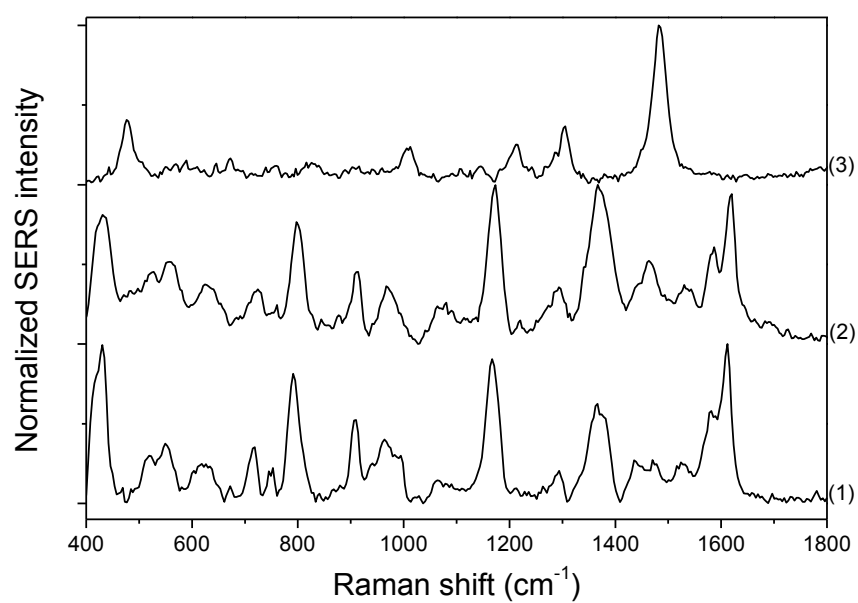


Figure 1 : SERS spectra of Syk WT (1), Syk dP (2) and Syk P (3)

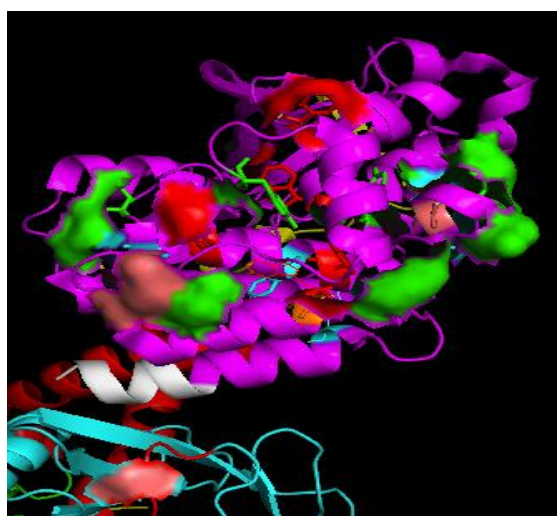


Figure 2: Syk WT structure with cysteine residues at position 101, 593 and 597 (orange) located at the periphery

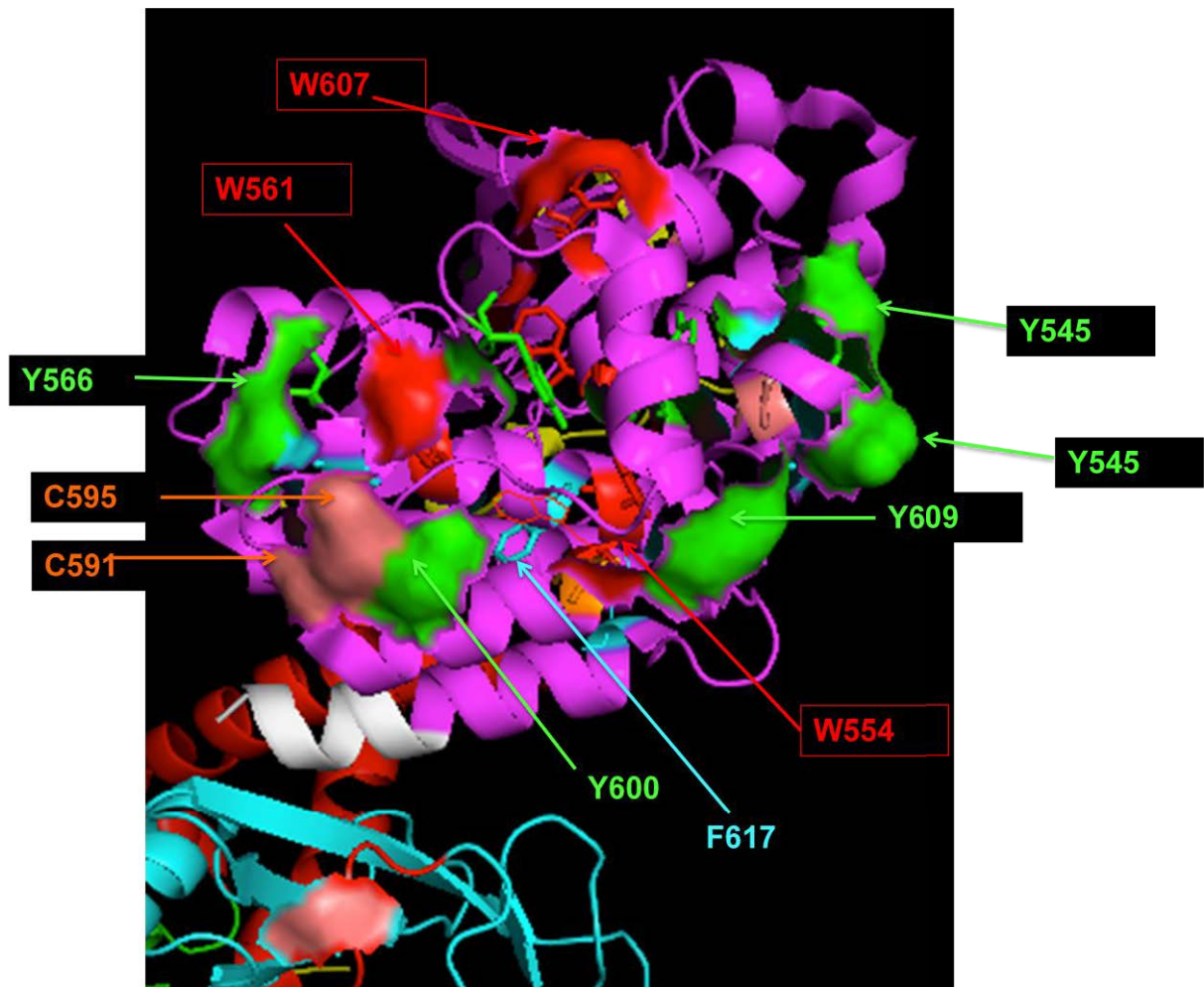


Figure 3: presence of W, F and Y close to the disulfide bond formed between C591 and C595



Figure 4: inter-domain B (yellow region)

VII. Discussion et perspectives

La position de la RPSL des nanostructures métalliques, en solution ou sur substrat, est dépendante de plusieurs paramètres: la forme, la taille ou la nature du métal [97, 189]. Cependant la position de la RPSL est également fortement sensible à l'indice de réfraction du milieu environnant [99, 190]. Plus la variation d'indice est importante et plus le décalage de la RPSL augmente. La sensibilité à un changement d'indice de réfraction dépend aussi de la forme et des dimensions des nanoparticules, la meilleure sensibilité étant obtenue pour des formes allongées [96]. Une variation d'indice peut être provoquée par une modification du milieu local environnant dans lequel se trouvent les nanostructures, mais aussi par la présence de molécules à la proximité des nanostructures. Ainsi, l'analyse de la position de la RPSL est utilisée pour la détection de molécules [102, 175, 191] et de protéines [176]. Pour des protéines ayant des poids moléculaires et des structures différentes, leur interaction avec une nanoparticule métallique devrait donc induire des décalages spécifiques de la position de la RPSL.

L'objectif de notre travail consistait alors à analyser le décalage de la position de la RPSL de nanostructures d'or colloïdales en fonction du poids moléculaire de différentes protéines. Dans le cadre de notre étude, les nanoparticules utilisées étaient des nanobâtonnets d'or recouverts d'une couche de CTAB. Les nanobâtonnets ayant deux longueurs (axes) différentes, deux positions de RPSL ont été mesurées. Les simulations, faites par FDTD pour calculer la position de la RPSL, ont montré que la couche de CTAB ne peut pas être considérée comme homogène sur toute la surface des nanobâtonnets. En effet, du fait du rayon de courbure à leurs extrémités, la densité en CTAB est plus faible à ces endroits que celle sur les parties planes des nanobâtonnets. Par conséquent, les protéines interagissent de manière préférentielle aux extrémités, comme l'indique nos mesures montrant un décalage de la RPSL plus important le long du grand axe que le long du petit axe. Cependant, le décalage moyen obtenu est constant et ne varie pas en fonction du poids moléculaire des protéines. Ce résultat peut être expliqué par l'encombrement stérique des protéines. En effet, les protéines de haut poids moléculaire étant plus grosses, elles nécessitent plus d'espace pour interagir avec la surface d'or, qui elle ne varie pas. Nous en déduisons que les petites protéines sont plus nombreuses à interagir avec la surface d'or que les grosses protéines. Il en résulte ainsi un indice de réfraction similaire qui engendre un décalage de la position de la RPSL identique

et indépendant du poids moléculaire des protéines. De plus, le décalage de la position de la RPSL engendré par les protéines n'est pas très important, inférieure à 10 nm. Généralement, la détection de protéine entraîne un décalage allant jusqu'à plusieurs dizaines de nanomètres [177, 192]. D'autre part, la position de la RPSL est sensible aux nombres de couches déposées sur la surface, et donc à la taille des protéines. Le décalage doit donc continuer à augmenter si le nombre de couches sur la surface s'accroît [193]. Nos résultats montrant un décalage faible de la position de la RPSL et indépendant de la taille des protéines, il semble donc que nos nanoparticules sont uniquement sensibles à ce qui se produit directement à la surface et qu'elles sont très peu sensibles aux couches supérieures situées à quelques nanomètres. Ceci indique également que la longueur de décroissance du PSL est de l'ordre de grandeur de la taille d'une protéine, soit quelques nanomètres seulement.

La suite de ce travail a été d'étudier l'effet de la concentration en protéines. Le décalage de la position de la RPSL augmente avec la concentration, ce qui est en accord avec le fait qu'il y ait plus de protéines qui interagissent avec l'or. Cependant, ce décalage n'est pas homogène en fonction des protéines. Nous avons ainsi observé des décalages très faibles et par conséquent une sensibilité de la RPSL extrêmement réduites vis à vis de l'augmentation de la concentration alors que pour d'autres protéines, la position de la RPSL est largement décalée vers le rouge et que sa largeur augmente. Cet élargissement est caractéristique d'une agrégation des nanoparticules. Après analyse de la structure des protéines, nous avons mis en évidence que le nombre de résidus cystéine accessibles (résidu comportant un groupe thiol, SH, ayant une forte affinité avec l'or), joue un rôle important dans la liaison des protéines avec la surface des nanoparticules. En effet, une protéine qui possède un seul résidu cystéine libre se lie à la surface d'or sans induire l'agrégation des nanoparticules, tandis qu'une protéine pour laquelle plusieurs résidus cystéine sont accessibles peut se lier à plusieurs nanoparticules, formant ainsi des agrégats de nanoparticules lorsque la concentration en protéine est importante. La liaison entre un groupe thiol et une surface d'or est également impliquée dans l'interaction entre le CTAB et les nanoparticules. Ainsi, il se peut que les protéines ayant une cystéine accessible entrent en compétition avec la couche de CTAB et la remplace à certains endroits. Ce phénomène peut expliquer le faible décalage observé. Les protéines engendrent un indice moyen légèrement plus important que celui de la couche de CTAB, mais pas suffisamment conséquent pour induire un fort décalage de la position de la RPSL.

Ces travaux nous indiquent que l'analyse de la position de la RPSL de nanoparticules peut être utilisée pour la détection de protéines très diverses en taille et poids moléculaire. En

revanche, l'absence de variation du décalage de la position de la RPSL en fonction du poids moléculaire des protéines indique qu'il est impossible d'identifier la protéine liée aux nanoparticules. Afin de pouvoir identifier les protéines interagissant avec les nanoparticules, il est nécessaire de fonctionnaliser la surface métallique avec une molécule capable d'interagir uniquement avec la protéine cible. Cette méthode de fonctionnalisation et de détection est utilisée pour le développement de biocapteurs [118, 194, 195], notamment pour la détection en milieu physiologique [142, 143]. Cependant, cette technique de mesure ne peut pas assurer l'identification de la protéine détectée, la spécificité étant la résultante de la fonctionnalisation de surface, et pas de la méthode de mesure. Par contre, des méthodes de mesures, comme la diffusion Raman, permettent d'identifier une protéine ou une interaction entre deux molécules [186]. Sur la base de ces résultats et dans le but d'acquérir une meilleure spécificité ainsi qu'une plus grande sensibilité de détection protéique, nous avons choisi d'utiliser la diffusion Raman exaltée de surface. Pour éviter les agrégations et obtenir un signal DRES reproductible, les colloïdes ont été remplacés par des nanostructures lithographiées sur des substrats de verre.

L'utilisation de nanostructures pour le développement d'un biocapteur basé sur la DRES nécessite une optimisation de ces nanostructures pour l'obtention d'une sensibilité optimale. Comme décrit précédemment dans ce manuscrit, l'intensité du signal DRES est étroitement liée à l'exaltation du champ électrique. Cette exaltation dépend elle-même directement de l'excitation de la RPSL. Intuitivement, il serait aisé de supposer que l'exaltation est maximale lorsque la longueur d'onde incidente est proche de la position de la RPSL. Toutefois, la relation entre la position de la RPSL, la longueur d'onde excitatrice et l'exaltation du signal en DRES n'est pas aussi simple et dépend fortement de la forme des nanostructures ou de la longueur d'onde du laser utilisée [121, 123]. Ceci est dû non seulement au fait que l'intensité DRES est le résultat de l'exaltation du champ aux deux longueurs d'onde excitatrice et Raman, mais également au fait que la DRES est un phénomène champ proche à l'inverse de la RPSL qui est une mesure du champ de lointain. Pour comprendre plus en détails ces deux phénomènes, nous avons étudié l'intensité DRES obtenue pour différentes longueurs d'onde excitatrices sur des nanostructures cylindriques non couplées. Ces données nous ont permis de mesurer l'exaltation du signal en fonction de la longueur d'onde excitatrice et de la position de la RPSL. De manière générale, il est couramment accepté que l'intensité maximale est obtenue lorsque la position de la RPSL se trouve entre la longueur d'onde excitatrice (λ_0) et la longueur d'onde Raman (λ_R) [117].

Pourtant, nous avons pu observer que l'exaltation la plus forte n'est pas toujours pour une position de la RPSL située entre la longueur d'onde laser et la longueur d'onde Raman étudiée. Ceci est particulièrement vrai lorsque le diamètre des nanocylindres augmente, plus leur diamètre est grand, ce qui correspond à des positions de la RPSL situées vers le proche IR, et plus le décalage entre la position optimale observée et la position attendue $((\lambda_0 + \lambda_R)/2)$ est grand. Zuloaga et al. explique ce décalage par la présence d'amortissement des plasmons, comme dans le cadre d'un oscillateur harmonique, lorsque la taille des nanostructures augmente [181]. Sur la base des résultats expérimentaux générés, des calculs par DDA ont été réalisés afin d'expliquer cette tendance. Ceci nous a permis d'établir un modèle simple donnant l'exaltation DRES maximale en fonction de la longueur d'onde d'excitation et de la position de la RPSL. Les calculs réalisés grâce au modèle de la DDA nous permettent de retrouver les données expérimentales. Il est donc possible de déterminer, en fonction du laser utilisé, la position de la RPSL qui donnera la meilleure exaltation. Cependant, nos calculs et mesures ont été réalisés pour des longueurs d'onde excitatrices, ainsi que des RPSL, situées au-dessus de 600 nm. La question se pose donc de savoir si notre modèle peut s'appliquer pour des longueurs d'ondes excitatrices plus faibles. En effet, il a été montré expérimentalement que pour une longueur d'onde excitatrice en dessous de 500 nm, l'intensité DRES optimale est obtenue pour une RPSL également situé entre λ_0 et λ_R [196, 197]. Mais il semble également que la relation entre la RPSL, l'intensité DRES maximale et la longueur d'onde laser soit dépendante de la forme des nanostructures. Pour des longueurs d'onde excitatrice en proche IR, et pour des nanocylindres, nous montrons que l'intensité DRES est maximale pour une RPSL plus faible que la longueur d'onde laser tandis que pour des nanotriangles, la RPSL est située pour des longueurs d'onde supérieures à la longueur d'onde laser [197]. La RPSL et l'intensité DRES dépendent de la forme des nanostructures, il semble normal que la relation les reliant soit aussi liée aux nanostructures. Notre modèle est donc applicable pour des nanocylindres mais il ne traduit pas forcément les phénomènes qui se produisent pour toutes les formes. Par conséquent, l'établissement d'un modèle doit tenir compte non seulement de la position de la RPSL et de la longueur d'onde laser, mais aussi de la forme des nanostructures.

Si le niveau de détection peut être amélioré par l'optimisation de l'exaltation, il ne doit pas se faire au détriment de la reproductibilité de l'intensité du signal. Il est important de rappeler que l'intensité du signal DRES est dépendante de l'exaltation du champ proche qui est elle-même dépendante des nanostructures utilisées. Les colloïdes sont des nanoparticules

permettant une détection DRES extrêmement sensible, jusqu'à la détection d'une molécule unique [127, 128], mais comme précisé précédemment, la phénomène d'agrégation des nanoparticules influence l'intensité DRES [198, 199]. Afin d'avoir un signal DRES dont l'intensité reste constante, les nanostructures, et la distance les séparant, se doivent d'être identiques sur toute la surface d'analyse. Parmi toutes les techniques présentées dans la section IV, nous avons choisi d'utiliser la lithographie électronique (LE) et de la lithographie par nanoimpression UV (LNI-UV). Par ailleurs, la détection de molécules par DRES a déjà été présentée pour ses deux techniques [123, 166, 173]. Cependant, la conception d'un biocapteur, utilisant des nanostructures fabriquées par ces lithographies, est peu développée. La lithographie électronique est l'approche la plus appropriée pour la fabrication de nanostructures pour l'application à un biocapteur. En effet, elle permet un contrôle précis de tous les paramètres géométriques des nanostructures liés à la RPSL (forme, taille, espacement). La seconde approche, la LNI-UV, a l'avantage de nanostructurer une grande surface de l'échantillon (de l'ordre du millimètre carré) en peu de temps et à moindre coût, tout en conservant une bonne reproductibilité des nanostructures. Lors de notre étude sur les seuils de détection obtenus sur des substrats produits par lithographie, nous avons démontré que le seuil de sensibilité est similaire entre la LNI-UV et la LE. En revanche, l'intensité du signal DRES varie significativement pour la LNI-UV (variation de 50%) alors qu'il est stable pour la LE (variation de seulement 10%). Cette fluctuation peut être liée à la rugosité des nanostructures qui est plus importante avec l'approche LNI-UV par rapport à celle avec la LE, mais non homogène sur toute la surface. L'effet de la rugosité des nanostructures sur le signal DRES mesuré a déjà été montré pour augmenter son intensité [200]. Cette augmentation de rugosité peut provenir de deux étapes de fabrication. La première concerne l'application du tampon en PDMS qui génère des inégalités de surface prononcées sur les côtés des nanostructures. La rugosité des échantillons LNI-UV créerait localement une exaltation plus forte du champ électrique, notamment par des effets de pointes. La seconde étape qui peut influencer la rugosité, mais également la dimension des nanostructures, est la gravure. En effet, le procédé de gravure est directif, c'est-à-dire qu'il se fait selon une direction. Si l'échantillon n'est pas correctement orienté par rapport à cette direction, la vitesse de gravure, ainsi que l'angle de gravure, vont alors être variables d'un endroit à un autre de la surface, créant ainsi une rugosité. Dans le cas où la gravure n'est pas homogène sur toute la surface, la taille et la forme des nanostructures peuvent différer. Ainsi, la variabilité des nanostructures sur la surface obtenue par LNI conduit à une intensité du signal DRES moins reproductible qu'en LE. Un recuit des échantillons permettrait de diminuer la rugosité des nanostructures et

augmenterait la reproductibilité de l'intensité du signal. Au niveau de la sensibilité, nos résultats montrent que le seuil de détection est de l'ordre de 10^{-9} M pour les deux approches. Pour descendre en dessous de ces limites de détection, nous avons étudié des nanostructures couplées (nanobâtonnets) produites par LE. Lorsque la distance entre deux nanostructures diminue, l'intensité DRES augmente fortement [201, 202]. Pour les nanostructures couplées, les résultats indiquent une reproductibilité de l'intensité du signal identique entre les nanobâtonnets et les nanocylindres. De plus, une meilleure sensibilité pour les nanobâtonnets a été obtenue ainsi qu'un rapport signal/bruit plus important. Il est donc possible de détecter des molécules ayant des concentrations de l'ordre de 10^{-12} M, et même inférieures. Ce niveau de détection atteint est suffisant pour la détection de protéines en milieu physiologique.

Cette étude indique que les lithographies électronique et par nanoimpression sont des techniques de fabrication des nanostructures qui permettent une détection de molécules en solution pour de faibles concentrations. Notre étude démontre également que la lithographie électronique assure une faible variation de l'intensité du signal DRES, alors qu'elle est plus importante pour les nanostructures conçues par lithographie par nanoimpression UV. Ces résultats indiquent que ces approches sont applicables pour la fabrication de biocapteurs sensibles et reproductibles.

Les trois principaux critères d'un biocapteur sont: la sensibilité, la reproductibilité et la spécificité. Grâce à nos travaux sur l'optimisation des nanostructures, nous avons pu démontrer les deux premiers critères: détection de molécules à des concentrations inférieures à 10^{-9} M et faible dispersion du signal DRES en LE. Cependant, si l'on souhaite détecter spécifiquement une protéine dans un milieu physiologique, donc dans un milieu complexe composé d'une grande diversité de molécules biologiques, il est important de concevoir un biocapteur sélectif, tout en conservant un niveau de détection suffisant. Ce dernier critère de sélectivité de notre biocapteur est assuré par une fonctionnalisation de surface spécifique de la protéine à détecter.

Dans un premier temps, nous nous sommes focalisés sur un système biorécepteur-protéine simple et facile à mettre en place. Pour cela, nous avons utilisé le système biotine-avidine sur des nanostructures LNI-UV. Ce système a également été choisi car cette interaction avait déjà été observée par DRES [186]. Nous nous sommes tout d'abord assurés de la fonctionnalisation et de la spécificité de notre système, par une étude du décalage de la résonance des plasmons de surface (RPS) sur des surfaces planes d'or. La surface d'or est

d'abord recouverte par la cystéamine qui possède un groupe thiol (SH) à une de ces extrémités. La seconde extrémité de la cystéamine, constituée d'un groupe amine (NH_2), interagit avec le groupe carboxyle (COOH) de la biotine, assurant l'absorption ainsi que l'orientation de cette dernière sur la surface et garantissant la détection spécifique de l'avidine. Ensuite, un dépôt de dodécanthiol permet de combler les espaces laissés libres par la cystéamine, et évite ainsi l'éventuelle interaction directe de l'avidine sur la surface d'or. Par conséquent, l'avidine ne sera détectée que si la liaison avec la biotine s'effectue. Nos résultats obtenus par RPS ont confirmé que cette fonctionnalisation de surface permet la détection de l'avidine. De plus, nos résultats de spécificité montrent que le décalage sur la position de la RPS, provoqué par la liaison de l'avidine, est identique avec ou sans dépôt de BSA au préalable. Ceci montre que la BSA ne se lie pas à la biotine, qui est alors toujours libre pour interagir avec l'avidine. Une fois cette mise au point réalisée, cette fonctionnalisation de surface a été appliquée aux nanostructures d'or pour une détection par DRES. Nos résultats indiquent que la réaction de fonctionnalisation de surface (cystéamine-biotine) donne un spectre DRES différent du spectre Raman de la biotine seule. Cette différence provient du fait qu'il se crée une liaison chimique entre la biotine et la cystéamine et nous observons donc la signature spectrale de cette interaction et non la somme des signaux de la biotine et de la cystéamine. De la même façon, le spectre DRES mesuré pour la détection de l'avidine est différent du signal Raman de l'avidine seule. Cette variation de signal a déjà été montrée pour la détection du même système mais avec une fonctionnalisation de surface différente [186] et peut être attribuée à l'interaction entre l'analyte et le biorécepteur. Par conséquent, une comparaison des spectres DRES entre avant et après dépôt de l'avidine démontre qu'il est possible d'observer le spectre de l'interaction entre l'avidine et la biotine, et donc de détecter l'avidine.

Ces résultats prouvent que la DRES peut être utilisée en association avec la lithographie par nanoimpression pour la fabrication de biocapteurs destinés à la détection de protéines. De plus, en tenant compte de la forte intensité du signal, la détection de l'avidine est possible pour des concentrations proches de la micromole. En optimisant l'exaltation du signal grâce à un meilleur ajustement de la RPSL en fonction de la longueur d'onde excitatrice utilisée, ou encore en variant la forme des nanostructures (bâtonnets, étoiles par exemple), il est envisageable de détecter des protéines à des concentrations inférieures à la micromole. Une augmentation graduelle de la concentration d'avidine déposée permettrait de déterminer expérimentalement cette limite de détection. En étudiant, par DRES, l'interaction entre la biotine et une protéine autre que l'avidine, la détection spécifique par DRES de l'avidine

serait démontrée. Ces investigations permettraient de prouver non seulement la sensibilité mais également la spécificité d'un biocapteur DRES développé utilisant des nanostructures fabriquées par LNI. De telles études n'ont pu être menées au cours de ma thèse car nous sommes intéressés à un modèle biologique plus intéressant car directement lié à l'applicabilité de la technique dans le domaine du diagnostic de maladies. En effet, nous avons utilisé la méthode DRES pour la détection de la MnSOD, un biomarqueur de maladies [26], en milieu physiologique.

Dans ce cadre, nous avons utilisé un autre biorécepteur que la biotine. Celui-ci est un aptamère capable d'interagir spécifiquement avec la MnSOD. Un aptamère est une séquence d'ADN qui est défini et synthétisé artificiellement pour interagir avec une seule protéine et présente de nombreux avantages par rapport aux anti-corps, couramment utilisés pour la détection de protéines par DRES en milieu physiologique [142, 143]. Pour fonctionnaliser la surface, une extrémité de l'aptamère est composé d'un groupe thiol afin qu'il s'attache à l'or. Dans le cas présent, la molécule utilisée pour saturer la surface d'or libre a été le mercapto-hexanol. Cette étape de saturation a été suivie par le dépôt de la solution contenant la MnSOD. Pour cette étude, deux longueurs d'onde excitatrices ainsi que différentes formes de nanostructures (nanocylindres et nanobâtonnets) ont été utilisées. Comme attendu, le spectre DRES après dépôt de la MnSOD, obtenu sur les nanostructures fonctionnalisées avec l'aptamère, est différent du spectre de l'aptamère. Les bandes spécifiques observées correspondent à celles de la protéine seule (obtenues lors d'un précédent travail [79]) permettant ainsi une identification précise de la protéine MnSOD. Une étude à différentes concentrations de MnSOD a permis de déterminer que notre biocapteur assure la détection de la protéine pour des concentrations de l'ordre de 10^{-8} M. Ces résultats prouvent qu'il est possible d'identifier la protéine et de détecter directement sa présence, même à faible concentration. De plus, le dépôt d'une protéine qui n'est pas capable de se lier à l'aptamère, la BSA dans notre cas, n'induit aucune variation du spectre DRES de l'aptamère, démontrant la spécificité de notre détection. Après s'être assuré de la sensibilité et de la spécificité, la détection de la protéine MnSOD a été réalisée dans deux milieux physiologiques, que sont le sérum et la salive, prélevés chez l'homme. Dans les deux cas, nos expériences démontrent que MnSOD est détectable pour des concentrations en protéine de l'ordre du 10^{-9} M.

Ce travail démontre que la combinaison de la DRES et de la lithographie électronique a permis la conception d'un biocapteur sensible et spécifique. Nos résultats de mesure dans les milieux physiologiques montrent que la sensibilité et la spécificité de notre biocapteur permet

la détection de la protéine endogène. Malgré l'utilisation de mêmes nanostructures, nos résultats montrent que le spectre DRES aptamère/MnSOD est variable, avec une intensité du signal qui n'est pas homogène sur toute la surface. Cette variation pourrait venir de la façon dont l'aptamère s'est déposé sur les nanostructures, ce qui conditionnerait l'interaction avec la MnSOD. En effet, si la MnSOD se lie sur les côtés de l'aptamère ou que l'espace entre deux aptamères est inférieur à celui nécessaire pour la liaison de la protéine, la liaison de MnSOD sera affectée. De plus, l'intensité du signal DRES n'augmente pas linéairement avec la concentration, ce qui suggère que la majorité des sites d'accroche possibles entre l'aptamère et la MnSOD est saturé à faible concentration (de l'ordre de 100 nM). L'établissement d'une courbe de calibration, qui donnerait l'intensité du signal DRES en fonction de la concentration en protéine, est possible à condition d'ajuster petit à petit la concentration (augmentation par pas de 1 nM en commençant à 1 nM). Ainsi, une détection quantitative de la protéine serait réalisable. La spécificité de l'aptamère a été testée uniquement avec la BSA. Il serait intéressant d'étudier l'interaction de l'aptamère avec d'autres protéines de la même famille, telle que ZnSOD ou CuSOD, confirmant la détection unique de la MnSOD.

Au delà de la détection en faible concentration de protéines, un autre avantage de l'approche DRES est d'obtenir la signature spectrale unique d'une protéine [130, 203]. Grâce à l'analyse des bandes obtenues (bandes amides caractéristiques de la structure, bandes des différents acides aminés aromatiques, etc), il est possible d'acquérir des informations précieuses sur la conformation protéique [69, 79, 137]. Un changement de la structure de la protéine d'intérêt induit donc un changement de sa signature spectrale [134, 187, 204]. Dans le cadre de ma co-direction avec le laboratoire ASIH, j'ai choisi d'étudier le spectre DRES de la protéine Syk, dont le modèle d'activation implique des modifications par phosphorylation, qui conduisent à au moins deux conformations [38]. Récemment, l'une des conformations de Syk, la forme non phosphorylée, a été obtenue par diffraction des rayons X [34]. En dehors de données générées par microscopie électronique [33], aucune donnée structurale résolutive n'a été obtenue sur la forme phosphorylée. L'étude de la structure de la protéine a été réalisée sur des nanocylindres produits par LE. Bien que les nanobâtonnets couplés donnent une meilleure sensibilité de détection, nous avons choisi l'utilisation des nanocylindres car il n'est pas possible d'estimer la position de la RPSL avec le mode de mesure utilisé pour l'étude de Syk. En effet, l'analyse de la structure de Syk devait se faire en milieu aqueux afin d'être dans les conditions les plus proches de celles *in vivo*. Par ailleurs, il est extrêmement difficile d'estimer le taux de recouvrement de la surface de la nanostructure par la protéine. Ces deux facteurs

(milieu aqueux et déposition aléatoire de la protéine sur l'échantillon) influençant significativement la position de la RSPL, il est difficile de prédire quelles nanostructures seront les plus appropriées. De ce fait, notre étude a été faite sur des nanocylindres de différents diamètres permettant ainsi l'obtention de plusieurs positions pour la RPSL et donc de choisir le nanocylindre qui donne le plus fort signal DRES. La protéine Syk, quant à elle, existait sous deux formes, une forme phosphorylée et une forme non phosphorylée, cette dernière ayant été obtenue à partir du processus de déphosphorylation de la protéine phosphorylée. En parallèle de l'étude structurale, l'activité kinase ainsi que l'implication de phosphorylations spécifiques (Y323, Y352 et Y525) décrites pour être associées à son activité, ont été observées par Western Blot (WB). Les résultats indiquent que lorsque Syk est globalement phosphorylée, elle l'est également sur les résidus Y323, Y352 et Y525, suggérant une protéine active. A l'inverse, lorsque Syk est déphosphorylée après l'ajout de la phosphatase CIP, elle ne l'est pas sur les résidus Y323, Y352 et Y525 indiquant que la protéine est probablement inactive. L'activité de ces deux formes a été mesurée par la capacité d'autophosphorylation de ces deux formes de Syk après l'ajout d'ATP *in vivo*. Conformément au modèle proposé [38], notre test kinase a confirmé que la forme modifiée de Syk est active alors que la forme non modifiée est catalytiquement inactive. Par ailleurs, les données acquises grâce aux spectres DRES des deux formes de la protéine montrent que Syk subit un réarrangement structural lorsqu'elle est phosphorylée. En effet, les spectres obtenus sont très différents mais indiquent tous deux l'existence de pics spécifiques d'acides aminés ainsi que des bandes amides II et III, caractéristiques de la structure de la protéine. L'analyse des pics du spectre de la forme non phosphorylée révèle que Syk interagit avec la surface d'or *via* un résidu cystéine de son inter-domaine A. De plus, ce spectre montre une très forte intensité des pics associés à certains acides aminés (phénylalanine, tyrosine, tryptophane), ce qui démontre leur présence en grand nombre proche de la surface de la nanostructure. En accord avec les résultats de la diffraction par rayons X, nous montrons que Syk ne perd pas sa structure lorsqu'elle interagit avec l'or. Par ailleurs, les spectres de Syk phosphorylée et Syk déphosphorylée sont différents, avec des variations comme une diminution de l'intensité de certains pics ainsi que leur décalage en position. Ces changements, qui sont connus pour être induits par la phosphorylation [134, 204], tendent vers un changement de structure de la protéine. Sachant que l'activité de la protéine dépend de sa phosphorylation, nos résultats démontrent donc que l'activité de Syk est directement liée à son changement structural. Sur la base de nos signatures spectrales et de la littérature, nous proposons deux modèles de la structure de la protéine, l'un pour lequel Syk est considérée comme non phosphorylée et

inactive et l'autre lorsqu'elle est phosphorylée et active. Sachant que les phosphorylations de Syk sont séquentielles, l'hypothèse d'états de phosphorylation partiels induisant des états structuraux transitoires peut être émise. Une étude de la structure de Syk graduellement phosphorylée, liée à une mesure de son activité permettrait de définir le nombre minimal de sites phosphorylés requis pour son changement de structure. Ces mesures devraient permettre l'établissement d'une banque de donnée de signatures spectrales de Syk, en fonction de son statut de phosphorylation et de son activité. Pour réaliser cette banque, l'approche la plus simple serait d'induire la phosphorylation « contrôlée » de Syk, puis de faire les mesures DRES. Une approche utilisant une cellule liquide et dans laquelle une mesure DRES serait effectuée en continue permettrait d'étudier les arrangements structuraux de Syk *in situ* en fonction de son degré de phosphorylation. En effet, dans un premier temps, la protéine en solution se lierait aux nanostructures d'or. Puis le passage d'une solution contenant les éléments nécessaires à la phosphorylation de Syk, permettrait à la protéine préalablement fixée de se phosphoryler séquentiellement tout en collectant un éventail des mesures spectrales DRES qui correspondraient aux états conformationnels transitoires de Syk. Il est à noter que ce système de mesure n'est envisageable que par un contrôle de la température ou la quantité d'ATP requise à la réaction kinase dans la cellule liquide. Sur la base de ces résultats, il serait intéressant d'analyser la structure de Syk endogène dans des cellules de personnes saines ou des personnes atteintes de maladies, comme la LLC. Une comparaison des signatures spectrales de Syk endogène permettrait de suggérer si cette protéine peut être considérée comme un éventuel biomarqueur de la LLC. En effet, s'il est possible d'identifier des différences significatives entre les spectres DRES de la protéine issue de personnes saines et de la protéine issue de patients, ces résultats démontreraient que Syk n'a pas la même structure ni la même activité. L'utilisation de l'approche DRES est donc une technique de choix pour la caractérisation structurale de protéines, avec et sans modifications par phosphorylation.

VIII. Conclusion

Dans ce manuscrit est présenté mon travail de thèse concernant le développement d'un biocapteur sensible, reproductible et spécifique utilisant la diffusion Raman exaltée de surface. Dans un premier temps, nous avons souhaité détecter des protéines à l'aide de nanoparticules en solution en se basant sur la résonance des plasmons de surface localisés. Nous avons montré que ce système permet la détection des protéines mais il nous est impossible de les identifier en se basant uniquement sur des mesures de RPSL. En effet, le décalage induit par les protéines sur la position de la RPSL était constant en fonction du poids moléculaire des protéines. C'est pourquoi, nous avons décidé de poursuivre notre travail sur la conception d'un biocapteur utilisant la DRES, ainsi que des surfaces nanostructurées à la place de nanoparticules colloïdales. Le choix du remplacement des nanoparticules colloïdales en solution par des surfaces nanostructurées a été fait dans le but de mieux contrôler l'intensité du signal DRES afin que celle-ci soit reproductible d'un biocapteur à un autre.

Nous avons mené des études pour l'optimisation des nanostructures afin d'obtenir une intensité DRES maximale tout en gardant un haut niveau de reproductibilité de cette intensité. Nous avons démontré que les techniques de lithographie, notamment la lithographie par nanoimpression ainsi que la lithographie électronique, assurent un excellent contrôle des paramètres géométriques des nanostructures et permettent la détection de molécules pour des concentrations de l'ordre de 10^{-9} M pour des cylindres, voir 10^{-12} M dans le cadre de nanostructures couplées. Ces deux techniques de fabrication assurent un niveau de reproductibilité convenable, sachant que la lithographie électronique assure une très faible variation de l'intensité DRES mesurée et donc une meilleure reproductibilité que la lithographie par nanoimpression. Toute fois, ces deux approches remplissent la condition de reproductibilité du biocapteur et l'optimisation des nanostructures donne lieu à une bonne sensibilité. Par ailleurs, la sensibilité mais surtout la spécificité du biocapteur sont dépendantes de la fonctionnalisation de la surface métallique des nanostructures.

Nous montrons qu'une surface d'or fonctionnalisée avec de la biotine assure la détection de l'avidine. Dans la même étude, nous avons démontré que notre système de fonctionnalisation est spécifique et que la détection de l'avidine peut se faire pour des concentrations inférieures à la micromole. Ces résultats ont été obtenus avec un biocapteur fabriqué par lithographie par nanoimpression, démontrant que cette technique est

envisageable pour la conception de biocapteurs utilisant la DRES. Par ailleurs, cette technique permet de produire un grand nombre d'échantillons ainsi que de nanostructurer de grandes surfaces pour de faibles coûts, ce qui ouvre la porte à une application à grande échelle, notamment dans le domaine médical, de l'utilisation de biocapteurs basés sur la DRES. L'application médicale a également été démontrée dans ce manuscrit. En effet, nous avons développé un biocapteur permettant la détection d'un biomarqueur, la manganèse superoxyde dismutase (MnSOD). Ce travail a été mené sur des nanostructures d'or produites par lithographie électronique puis fonctionnalisées avec un aptamère. Cet aptamère, qui est une séquence d'ADN synthétisée pour avoir une forte affinité avec la protéine d'intérêt, nous a permis de détecter la MnSOD à des concentrations de l'ordre de la nanomole. De plus, suite à la démonstration de la spécificité de la détection, ce biocapteur a pu être appliqué à la détection de la protéine dans des milieux physiologiques. Ainsi, le signal DRES de la MnSOD a pu être mesuré dans la salive ainsi que dans le sérum. Ces derniers résultats démontrent la possibilité d'utiliser les biocapteurs DRES à des fins médicales pour la détection de biomarqueurs. Par ailleurs, l'établissement d'une courbe de calibration indiquerait la concentration de la protéine dans le milieu considéré, et donc son niveau d'expression.

En plus d'un fort niveau de sensibilité assurant la détection de protéine en faible concentration, la DRES est une excellente approche pour caractériser la structure des protéines. Nous avons étudié une autre protéine d'intérêt biologique, la spleen tyrosine kinase, Syk, qui est une protéine jouant un rôle dans une leucémie (leucémie lymphoïde chronique). Son niveau d'activité kinase est prépondérant dans ses interactions avec d'autres protéines, or cette activité est liée à son état de phosphorylation, ce qui influence la structure de la protéine. En effet, nous montrons que la forme phosphorylée et la forme non phosphorylée de Syk présentent des spectres DRES différents. Nous avons pu relier ces spectres à la conformation de la protéine, démontrant ainsi que la phosphorylation induit des variations dans la structure protéique. Par ailleurs, des mesures d'activité nous ont permis de mettre en évidence que la protéine phosphorylée est active tandis que la protéine non phosphorylée ne l'est pas. Grâce à toutes ces données, nous avons démontré que l'activité de la protéine Syk est directement liée à sa structure.

Les différents travaux réalisés au cours de cette thèse indiquent la possibilité d'utiliser la DRES non seulement pour observer des changements structuraux de protéine induit par des modifications post-traductionnelles, mais aussi pour la conception d'un biocapteur

reproductible, sensible et spécifique. Afin d'observer les variations de structures des protéines, les surfaces métalliques ne sont pas fonctionnalisées contrairement à celle des biocapteurs. Cependant, la création d'une fonctionnalisation de surface n'influençant pas la structure de la protéine et n'ayant pas un fort signal DRES, pourrait permettre l'étude de la structure des protéines endogènes, ce qui pourrait permettre une meilleure compréhension de certaines pathologies ainsi que de leur évolution.

IX. Références

1. Sanger, F. and H. Tuppy, *The amino-acid sequence in the phenylalanyl chain of insulin*. 2. *The investigation of peptides from enzymic hydrolysates*. Biochem. J., 1951. **49**(4): p. 481-490.
2. Ramachandran, G.N., C. Ramakrishnan, and V. Sasisekharan, *STEREOCHEMISTRY OF POLYPEPTIDE CHAIN CONFIGURATIONS*. Journal of Molecular Biology, 1963. **7**(1): p. 95-99.
3. Pauling, L., R.B. Corey, and H.R. Branson, *The structure of proteins: Two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1951. **37**(4): p. 205-211.
4. Kendrew, J.C., et al., *3-DIMENSIONAL MODEL OF THE MYOGLOBIN MOLECULE OBTAINED BY X-RAY ANALYSIS*. Nature, 1958. **181**(4610): p. 662-666.
5. Blake, C.C.F., et al., *STRUCTURE OF HEN EGG-WHITE LYSOZYME - A 3-DIMENSIONAL FOURIER SYNTHESIS AT 2 Å RESOLUTION*. Nature, 1965. **206**(4986): p. 757-761.
6. Chou, P.Y. and G.D. Fasman, *Conformational parameters for amino acids in helical, β -sheet, and random coil regions calculated from proteins*. Biochemistry, 1974. **13**(2): p. 211-222.
7. Levitt, M. and J. Greer, *Automatic identification of secondary structure in globular proteins*. Journal of Molecular Biology, 1977. **114**(2): p. 181-239.
8. Sun, Z.-B., et al., *Statistical characters of mean backbone torsion angles of proteins*. Physica A: Statistical Mechanics and its Applications, 2006. **368**(1): p. 155-164.
9. Smith, L.J., et al., *Analysis of Main Chain Torsion Angles in Proteins: Prediction of NMR Coupling Constants for Native and Random Coil Conformations*. Journal of Molecular Biology, 1996. **255**(3): p. 494-506.
10. Xin, F.X. and P. Radivojac, *Post-translational modifications induce significant yet not extreme changes to protein structure*. Bioinformatics, 2012. **28**(22): p. 2905-2913.
11. Nishi, H., A. Shaytan, and A.R. Panchenko, *Physicochemical mechanisms of protein regulation by phosphorylation*. Frontiers in Genetics, 2014. **5**, 270.
12. Groban, E.S., A. Narayanan, and M.P. Jacobson, *Conformational Changes in Protein Loops and Helices Induced by Post-Translational Phosphorylation*. PLoS Comput Biol, 2006. **2**(4): p. e32.
13. Pilizota, T., B. Lucic, and N. Trinajstić, *Use of variable selection in modeling the secondary structural content of proteins from their composition of amino acid residues*. Journal of Chemical Information and Computer Sciences, 2004. **44**(1): p. 113-121.
14. Cid, H., et al., *Prediction of secondary structure of proteins by means of hydrophobicity profiles*. FEBS Letters, 1982. **150**(1): p. 247-254.
15. Jones, D.D., *Amino acid properties and side-chain orientation in proteins: A cross correlation approach*. Journal of Theoretical Biology, 1975. **50**(1): p. 167-183.
16. Narayanan, A. and M.P. Jacobson, *Computational studies of protein regulation by post-translational phosphorylation*. Current Opinion in Structural Biology, 2009. **19**(2): p. 156-163.
17. Lätzer, J., T. Shen, and P.G. Wolynes, *Conformational Switching upon Phosphorylation: A Predictive Framework Based on Energy Landscape Principles*. Biochemistry, 2008. **47**(7): p. 2110-2122.
18. Fridovich, I., *Superoxide Dismutases*. Annual Review of Biochemistry, 1975. **44**(1): p. 147-159.
19. Borgstahl, G.E.O., et al., *The structure of human mitochondrial manganese superoxide dismutase reveals a novel tetrameric interface of two 4-helix bundles*. Cell, 1992. **71**(1): p. 107-118.
20. Weisiger, R.A. and I. Fridovich, *Superoxide Dismutase: ORGANELLE SPECIFICITY*. Journal of Biological Chemistry, 1973. **248**(10): p. 3582-3592.
21. Mukhopadhyay, S., S.K. Das, and S. Mukherjee, *Expression of Mn-Superoxide Dismutase Gene in Nontumorigenic and Tumorigenic Human Mammary Epithelial Cells*. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2004. **4**: p. 195-202.
22. Christianson, D.W., *Structural chemistry and biology of manganese metalloenzymes*. Progress in Biophysics and Molecular Biology, 1997. **67**(2-3): p. 217-252.
23. Epperly, M.W., et al., *Radioprotection of lung and esophagus by overexpression of the human manganese superoxide dismutase transgene*. Military Medicine, 2002. **167**(2): p. 71-73.
24. Li, J.-J. and L.W. Oberley, *Overexpression of Manganese-containing Superoxide Dismutase Confers Resistance to the Cytotoxicity of Tumor Necrosis Factor α and/or Hyperthermia*. Cancer Research, 1997. **57**(10): p. 1991-1998.

25. Tamai, T., et al., *Serum manganese superoxide dismutase and thioredoxin are potential prognostic markers for hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma*. World J Gastroenterol, 2011. **17**(44): p. 4890-8.
26. Kawaguchi, T., et al., *Serum-manganese-superoxide dismutase: normal values and increased levels in patients with acute myocardial infarction and several malignant diseases determined by an enzyme-linked immunosorbent assay using a monoclonal antibody*. Journal of Immunological Methods, 1990. **127**(2): p. 249-254.
27. Ishikawa, M., et al., *Reactivity of a Monoclonal Antibody to Manganese Superoxide Dismutase with Human Ovarian Carcinoma*. Cancer Research, 1990. **50**(8): p. 2538-2542.
28. Kinscherf, R., et al., *Apoptosis caused by oxidized LDL is manganese superoxide dismutase and p53 dependent*. The FASEB Journal, 1998. **12**(6): p. 461-467.
29. Zhang, H.J., et al., *Activation of Matrix Metalloproteinase-2 by Overexpression of Manganese Superoxide Dismutase in Human Breast Cancer MCF-7 Cells Involves Reactive Oxygen Species*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(23): p. 20919-20926.
30. Oberley, L.W. and G.R. Buettner, *Role of Superoxide Dismutase in Cancer: A Review*. Cancer Research, 1979. **39**(4): p. 1141-1149.
31. Heizmann, B., M. Reth, and S. Infantino, *Syk is a dual-specificity kinase that self-regulates the signal output from the B-cell antigen receptor*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010. **107**(43): p. 18563-18568.
32. Latour, S., L.M.L. Chow, and A. Veillette, *Differential Intrinsic Enzymatic Activity of Syk and Zap-70 Protein-tyrosine Kinases*. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(37): p. 22782-22790.
33. Arias-Palomo, E., et al., *Conformational rearrangements upon Syk auto-phosphorylation*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, 2009. **1794**(8): p. 1211-1217.
34. Gradler, U., et al., *Structural and Biophysical Characterization of the Syk Activation Switch*. Journal of Molecular Biology, 2013. **425**(2): p. 309-333.
35. Mócsai, A., J. Ruland, and V.L.J. Tybulewicz, *The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(6): p. 387-402.
36. Reth, M., *Antigen receptor tail clue*. Nature, 1989. **338**(6214): p. 383-384.
37. Furlong, M.T., et al., *Identification of the major sites of autophosphorylation of the murine protein-tyrosine kinase Syk*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 1997. **1355**(2): p. 177-190.
38. de Castro, R.O., *Regulation and Function of Syk Tyrosine Kinase in Mast Cell Signaling and Beyond*. Journal of Signal Transduction, 2011. **2011**.
39. Deckert, M., et al., *Functional and Physical Interactions of Syk Family Kinases with the Vav Proto-Oncogene Product*. Immunity, 1996. **5**(6): p. 591-604.
40. Turner, M., et al., *PERINATAL LETHALITY AND BLOCKED B-CELL DEVELOPMENT IN MICE LACKING THE TYROSINE KINASE SYK*. Nature, 1995. **378**(6554): p. 298-302.
41. Geahlen, R.L., *Getting Syk: spleen tyrosine kinase as a therapeutic target*. Trends in Pharmacological Sciences, 2014, **35** (8),p:414-422.
42. Pleyer, L., et al., *Molecular and cellular mechanisms of CLL: novel therapeutic approaches*. Nat Rev Clin Oncol, 2009. **6**(7): p. 405-418.
43. Le Roy, C., et al., *The degree of BCR and NFAT activation predicts clinical outcomes in chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2012. **120**(2): p. 356-365.
44. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1977. **74**(12): p. 5463-5467.
45. Edman, P., *METHOD FOR DETERMINATION OF THE AMINO ACID SEQUENCE IN PEPTIDES*. Acta Chemica Scandinavica, 1950. **4**(2): p. 283-293.
46. Smyth, M.S. and J.H.J. Martin, *x Ray crystallography*. Journal of Clinical Pathology-Molecular Pathology, 2000. **53**(1): p. 8-14.
47. Beauchamp, J.C. and N.W. Isaacs, *Methods for X-ray diffraction analysis of macromolecular structures*. Current Opinion in Chemical Biology, 1999. **3**(5): p. 525-529.
48. Caffrey, M., *Membrane protein crystallization*. Journal of Structural Biology, 2003. **142**(1): p. 108-132.
49. Davies, C., et al., *The crystal structure of ribosomal protein S4 reveals a two-domain molecule with an extensive RNA-binding surface: one domain shows structural homology to the ETS DNA-binding motif*. Embo J, 1998. **17**(16): p. 4545-58.
50. Huang, H., et al., *Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: implications for drug resistance*. Science, 1998. **282**(5394): p. 1669-75.
51. Weissenhorn, W., et al., *Crystal structure of the Ebola virus membrane fusion subunit, GP2, from the envelope glycoprotein ectodomain*. Mol Cell, 1998. **2**(5): p. 605-16.

52. Buchanan, S.K., et al., *Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from Escherichia coli*. Nat Struct Biol, 1999. **6**(1): p. 56-63.
53. Malashkevich, V.N., et al., *Crystal structure of the simian immunodeficiency virus (SIV) gp41 core: conserved helical interactions underlie the broad inhibitory activity of gp41 peptides*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(16): p. 9134-9.
54. Sutton, R.B., et al., *Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4[thinsp]Å resolution*. Nature, 1998. **395**(6700): p. 347-353.
55. Ferguson, A.D., et al., *Siderophore-mediated iron transport: crystal structure of FhuA with bound lipopolysaccharide*. Science, 1998. **282**(5397): p. 2215-20.
56. Kobe, B., et al., *Crystal structure of human T cell leukemia virus type 1 gp21 ectodomain crystallized as a maltose-binding protein chimera reveals structural evolution of retroviral transmembrane proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(8): p. 4319-24.
57. Hubbard, S.R. and J.H. Till, *Protein tyrosine kinase structure and function*. Annual Review of Biochemistry, 2000. **69**: p. 373-398.
58. Joyce, C.M. and T.A. Steitz, *FUNCTION AND STRUCTURE RELATIONSHIPS IN DNA-POLYMERASES*. Annual Review of Biochemistry, 1994. **63**: p. 777-822.
59. Hubbard, S.R., *Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog*. Vol. 16. 1997. 5572-5581.
60. Ravelli, R.B.G. and S.M. McSweeney, *The 'fingerprint' that X-rays can leave on structures*. Structure, 2000. **8**(3): p. 315-328.
61. Carugo, O. and K.D. Carugo, *When X-rays modify the protein structure: radiation damage at work*. Trends in Biochemical Sciences, 2005. **30**(4): p. 213-219.
62. Bloch, F., W.W. Hansen, and M. Packard, *The Nuclear Induction Experiment*. Physical Review, 1946. **70**(7-8): p. 474-485.
63. Purcell, E.M., H.C. Torrey, and R.V. Pound, *Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid*. Physical Review, 1946. **69**(1-2): p. 37-38.
64. Bax, A. and S. Grzesiek, *Methodological advances in protein NMR*. Accounts of Chemical Research, 1993. **26**(4): p. 131-138.
65. Ernst, R.R., *Sensitivity Enhancement in Magnetic Resonance*, in *Advances in Magnetic and Optical Resonance*, S.W. John, Editor 1966, Academic Press. p. 1-135.
66. Williamson, M.P., T.F. Havel, and K. Wüthrich, *Solution conformation of proteinase inhibitor IIA from bull seminal plasma by 1H nuclear magnetic resonance and distance geometry*. Journal of Molecular Biology, 1985. **182**(2): p. 295-315.
67. Kanelis, V., J.D. Forman-Kay, and L.E. Kay, *Multidimensional NMR Methods for Protein Structure Determination*. IUBMB Life, 2001. **52**(6): p. 291-302.
68. Tugarinov, V., P.M. Hwang, and L.E. Kay, *NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPY OF HIGH-MOLECULAR-WEIGHT PROTEINS*. Annual Review of Biochemistry, 2004. **73**(1): p. 107-146.
69. Schweitzer-Stenner, R., *Advances in vibrational spectroscopy as a sensitive probe of peptide and protein structure - A critical review*. Vibrational Spectroscopy, 2006. **42**(1): p. 98-117.
70. Choi, J.-H., S. Ham, and M. Cho, *Local Amide I Mode Frequencies and Coupling Constants in Polypeptides*. The Journal of Physical Chemistry B, 2003. **107**(34): p. 9132-9138.
71. Reisdorf, W.C. and S. Krimm, *Infrared Amide I' Band of the Coiled Coil†*. Biochemistry, 1996. **35**(5): p. 1383-1386.
72. Overman, S.A. and G.J. Thomas, *Amide Modes of the α-Helix: Raman Spectroscopy of Filamentous Virus fd Containing Peptide 13C and 2H Labels in Coat Protein Subunits†*. Biochemistry, 1998. **37**(16): p. 5654-5665.
73. Sane, S.U., S.M. Cramer, and T.M. Przybycien, *A Holistic Approach to Protein Secondary Structure Characterization Using Amide I Band Raman Spectroscopy*. Analytical Biochemistry, 1999. **269**(2): p. 255-272.
74. Fu, F.N., et al., *SECONDARY STRUCTURE ESTIMATION OF PROTEINS USING THE AMIDE-III REGION OF FOURIER-TRANSFORM INFRARED-SPECTROSCOPY - APPLICATION TO ANALYZE CALCIUM BINDING-INDUCED STRUCTURAL-CHANGES IN CALSEQUESTRIN*. Appl Spectrosc, 1994. **48**(11): p. 1432-1441.
75. Nogami, N., H. Sugeta, and T. Miyazawa, *C-S STRETCHING VIBRATIONS AND MOLECULAR-CONFORMATIONS OF METHYL PROPYL SULFIDE AND RELATED ALKYL SULFIDES*. Chemistry Letters, 1975(2): p. 147-150.
76. Sugeta, H., A. Go, and T. Miyazawa, *VIBRATIONAL-SPECTRA AND MOLECULAR-CONFORMATIONS OF DIALKYL DISULFIDES*. Bulletin of the Chemical Society of Japan, 1973. **46**(11): p. 3407-3411.

77. Vandael, H., J.P. Lafaut, and F. Vancauwelaert, *TYROSINE GROUP-BEHAVIOR IN BOVINE ALPHA-LACTALBUMIN AS REVEALED BY ITS RAMAN EFFECT*. European Biophysics Journal with Biophysics Letters, 1987. **14**(7): p. 409-414.
78. Yu, N.T. and E.J. East, *LASER RAMAN SPECTROSCOPIC STUDIES OF OCULAR LENS AND ITS ISOLATED PROTEIN-FRACTIONS*. Journal of Biological Chemistry, 1975. **250**(6): p. 2196-2202.
79. David, C., et al., *Raman and IR spectroscopy of manganese superoxide dismutase, a pathology biomarker*. Vibrational Spectroscopy, 2012. **62**(0): p. 50-58.
80. Hartstein, A., J.R. Kirtley, and J.C. Tsang, *ENHANCEMENT OF THE INFRARED-ABSORPTION FROM MOLECULAR MONOLAYERS WITH THIN METAL OVERLAYERS*. Physical Review Letters, 1980. **45**(3): p. 201-204.
81. Zhang, Z., et al., *Surface-Enhanced Raman Scattering and Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopic Studies of a Metalloporphyrin Monolayer Film Formed on Pyridine Self-Assembled Monolayer-Modified Gold*. Langmuir, 2001. **17**(15): p. 4564-4568.
82. Enders, D., et al., *Surface-enhanced ATR-IR spectroscopy with interface-grown plasmonic gold-island films near the percolation threshold*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2011. **13**(11): p. 4935-4941.
83. Pucci, A., et al., *Surface enhanced infrared spectroscopy using gold nanoantennas*. physica status solidi (b), 2010. **247**(8): p. 2071-2074.
84. Neubrech, F., et al., *Resonant Plasmonic and Vibrational Coupling in a Tailored Nanoantenna for Infrared Detection*. Physical Review Letters, 2008. **101**(15): p. 157403.
85. Qian, W., J. Bandekar, and S. Krimm, *VIBRATIONAL ANALYSIS OF PEPTIDES, POLYPEPTIDES, AND PROTEINS .41. VIBRATIONAL ANALYSIS OF CRYSTALLINE TRI-L-ALANINE*. Biopolymers, 1991. **31**(2): p. 193-210.
86. Pelton, J.T. and L.R. McLean, *Spectroscopic Methods for Analysis of Protein Secondary Structure*. Analytical Biochemistry, 2000. **277**(2): p. 167-176.
87. Désormeaux, A., et al., *Amino acid sequence of a non-specific wheat phospholipid transfer protein and its conformation as revealed by infrared and Raman spectroscopy. Role of disulfide bridges and phospholipids in the stabilization of the α -helix structure*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology, 1992. **1121**(1-2): p. 137-152.
88. Raman, C.V., *A change of wave-length in light scattering*. Nature, 1928. **121**: p. 619-619.
89. Raman, C.V. and K.S. Krishnan, *The negative absorption of radiation*. Nature, 1928. **122**: p. 12-13.
90. Maiti, N.C., et al., *Raman Spectroscopic Characterization of Secondary Structure in Natively Unfolded Proteins: α -Synuclein*. Journal of the American Chemical Society, 2004. **126**(8): p. 2399-2408.
91. David, C., et al., *SERS detection of biomolecules using lithographed nanoparticles towards a reproducible SERS biosensor*. Nanotechnology, 2010. **21**(47): p. 475501.
92. Wen, Z.Q., *Raman spectroscopy of protein pharmaceuticals*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2007. **96**(11): p. 2861-2878.
93. Rudberg, E., *Characteristic energy losses of electrons scattered from incandescent solids*. Proceedings of the Royal Society of London Series a-Containing Papers of a Mathematical and Physical Character, 1930. **127**(804): p. 111-140.
94. Otto, A., *EXCITATION OF NONRADIATIVE SURFACE PLASMA WAVES IN SILVER BY METHOD OF FRUSTRATED TOTAL REFLECTION*. Zeitschrift Fur Physik, 1968. **216**(4): p. 398-&.
95. Kretschm.E, *DETERMINATION OF OPTICAL CONSTANTS OF METALS BY EXCITATION OF SURFACE PLASMONS*. Zeitschrift Fur Physik, 1971. **241**(4): p. 313-&.
96. Chen, H., et al., *Shape- and Size-Dependent Refractive Index Sensitivity of Gold Nanoparticles*. Langmuir, 2008. **24**(10): p. 5233-5237.
97. Grand, J., et al., *Optical Extinction Spectroscopy of Oblate, Prolate and Ellipsoid Shaped Gold Nanoparticles: Experiments and Theory*. Plasmonics, 2006. **1**(2-4): p. 135-140.
98. Link, S. and M.A. El-Sayed, *Shape and size dependence of radiative, non-radiative and photothermal properties of gold nanocrystals*. International Reviews in Physical Chemistry, 2000. **19**(3): p. 409-453.
99. Mock, J.J., D.R. Smith, and S. Schultz, *Local Refractive Index Dependence of Plasmon Resonance Spectra from Individual Nanoparticles*. Nano Letters, 2003. **3**(4): p. 485-491.
100. Mie, G., *Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen*. Annalen der Physik, 1908. **330**(3): p. 377-445.
101. Haes, A.J. and R.P. Van Duyne, *A Nanoscale Optical Biosensor: Sensitivity and Selectivity of an Approach Based on the Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy of Triangular Silver Nanoparticles*. Journal of the American Chemical Society, 2002. **124**(35): p. 10596-10604.
102. Barbillon, G., et al., *Electron beam lithography designed chemical nanosensors based on localized surface plasmon resonance*. Surface Science, 2007. **601**(21): p. 5057-5061.

103. Fujiwara, K., et al., *Measurement of antibody binding to protein immobilized on gold nanoparticles by localized surface plasmon spectroscopy*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2006. **386**(3): p. 639-644.
104. Kim, D.-K., et al., *Label-free optical detection of aptamer–protein interactions using gold-capped oxide nanostructures*. Analytical Biochemistry, 2008. **379**(1): p. 1-7.
105. Fleischmann, M., P.J. Hendra, and A.J. McQuillan, *Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode*. Chemical Physics Letters, 1974. **26**(2): p. 163-166.
106. Jeanmaire, D.L. and R.P. Van Duyne, *Surface raman spectroelectrochemistry: Part I. Heterocyclic, aromatic, and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode*. Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry, 1977. **84**(1): p. 1-20.
107. Moskovits, M., *Surface roughness and the enhanced intensity of Raman scattering by molecules adsorbed on metals*. The Journal of Chemical Physics, 1978. **69**(9): p. 4159-4161.
108. Otto, A., *Surface-enhanced Raman scattering: "Classical" and "Chemical" origins*, in *Light Scattering in Solids IV*, M. Cardona and G. Güntherodt, Editors. 1984, Springer Berlin Heidelberg. p. 289-418.
109. Campion, A. and P. Kambhampati, *Surface-enhanced Raman scattering*. Chemical Society Reviews, 1998. **27**(4): p. 241-250.
110. Moskovits, M., *Surface-enhanced Raman spectroscopy: a brief retrospective*. Journal of Raman Spectroscopy, 2005. **36**(6-7): p. 485-496.
111. Moskovits, M., *Surface-enhanced spectroscopy*. Reviews of Modern Physics, 1985. **57**(3): p. 783-826.
112. Otto, A., et al., *Enhanced Inelastic Light Scattering from Metal Electrodes Caused by Adatoms*. Physical Review Letters, 1980. **45**(1): p. 46-49.
113. Pockrand, I., et al., *Optical properties of organic dye monolayers by surface plasmon spectroscopy*. The Journal of Chemical Physics, 1978. **69**(9): p. 4001-4011.
114. Dornhaus, R., et al., *Surface plasmon contribution to SERS*. Surface Science, 1980. **101**(1-3): p. 367-373.
115. Aroca, R.F., et al., *Surface-enhanced Raman scattering on colloidal nanostructures*. Advances in Colloid and Interface Science, 2005. **116**(1-3): p. 45-61.
116. Wokaun, A., *Surface-Enhanced Electromagnetic Processes*, in *Solid State Physics*, D.T. Henry Ehrenreich and S. Frederick, Editors. 1984, Academic Press. p. 223-294.
117. Felidj, N., et al., *Optimized surface-enhanced Raman scattering on gold nanoparticle arrays*. Applied Physics Letters, 2003. **82**(18): p. 3095-3097.
118. Haynes, C.L. and R.P. Van Duyne, *Plasmon-Sampled Surface-Enhanced Raman Excitation Spectroscopy†*. The Journal of Physical Chemistry B, 2003. **107**(30): p. 7426-7433.
119. Grand, J., et al., *Optimization of SERS-active substrates for near-field Raman spectroscopy*. Synthetic Metals, 2003. **139**(3): p. 621-624.
120. Grand, J., et al., *Role of localized surface plasmons in surface-enhanced Raman scattering of shape-controlled metallic particles in regular arrays*. Physical Review B, 2005. **72**(3),p: 033407.
121. Billot, L., et al., *Surface enhanced Raman scattering on gold nanowire arrays: Evidence of strong multipolar surface plasmon resonance enhancement*. Chemical Physics Letters, 2006. **422**(4-6): p. 303-307.
122. Laurent, G., et al., *Evidence of multipolar excitations in surface enhanced Raman scattering*. Physical Review B, 2005. **71**(4): p. 045430.
123. Guillot, N., et al., *Surface enhanced Raman scattering optimization of gold nanocylinder arrays: Influence of the localized surface plasmon resonance and excitation wavelength*. Applied Physics Letters, 2010. **97**(2): p. 023113-3.
124. Camden, J.P., et al., *Probing the Structure of Single-Molecule Surface-Enhanced Raman Scattering Hot Spots*. Journal of the American Chemical Society, 2008. **130**(38): p. 12616-12617.
125. Li, W., et al., *Dimers of Silver Nanospheres: Facile Synthesis and Their Use as Hot Spots for Surface-Enhanced Raman Scattering*. Nano Letters, 2008. **9**(1): p. 485-490.
126. Kessentini, S., et al., *Gold Dimer Nanoantenna with Slanted Gap for Tunable LSPR and Improved SERS*. The Journal of Physical Chemistry C, 2014. **118**(6): p. 3209-3219.
127. Nie, S. and S.R. Emory, *Probing Single Molecules and Single Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering*. Science, 1997. **275**(5303): p. 1102-1106.
128. Kneipp, K., et al., *Single Molecule Detection Using Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS)*. Physical Review Letters, 1997. **78**(9): p. 1667-1670.
129. Han, X., B. Zhao, and Y. Ozaki, *Surface-enhanced Raman scattering for protein detection*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2009. **394**(7): p. 1719-1727.
130. Culha, M., *Surface-Enhanced Raman Scattering: An Emerging Label-Free Detection and Identification Technique for Proteins*. Appl Spectrosc, 2013. **67**(4): p. 355-364.

131. Das, G., et al., *Attomole (amol) myoglobin Raman detection from plasmonic nanostructures*. Microelectronic Engineering, 2008. **85**(5–6): p. 1282-1285.
132. Das, G., et al., *Plasmon based biosensor for distinguishing different peptides mutation states*. Sci. Rep., 2013. **3**: 1792.
133. Domenici, F., A.R. Bizzarri, and S. Cannistraro, *Surface-enhanced Raman scattering detection of wild-type and mutant p53 proteins at very low concentration in human serum*. Analytical Biochemistry, 2012. **421**(1): p. 9-15.
134. Siddhanta, S., et al., *Surface enhanced Raman spectroscopy of Aurora kinases: direct, ultrasensitive detection of autophosphorylation*. RSC Advances, 2013. **3**(13): p. 4221-4230.
135. Zhang, D., et al., *Detection of the site of phosphorylation in a peptide using Raman spectroscopy and partial least squares discriminant analysis*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2005. **61**(3): p. 471-475.
136. Moger, J. and C.P. Winlove. *Feasibility of detecting peptide phosphorylation by surface enhanced Raman scattering*. 2006 .
137. Hu, J., et al., *Surface enhanced Raman spectroscopy of lysozyme*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 1995. **51**(6): p. 1087-1096.
138. De Gelder, J., et al., *Reference database of Raman spectra of biological molecules*. Journal of Raman Spectroscopy, 2007. **38**(9): p. 1133-1147.
139. Kurouski, D., et al., *Amide I vibrational mode suppression in surface (SERS) and tip (TERS) enhanced Raman spectra of protein specimens*. Analyst, 2013. **138**(6): p. 1665-1673.
140. Douglas, P., et al., *Immunoassay for P38 MAPK using surface enhanced resonance Raman spectroscopy (SERRS)*. Analyst, 2008. **133**(6): p. 791-796.
141. Xu, S., et al., *Surface-enhanced Raman scattering studies on immunoassay*. Journal of Biomedical Optics, 2005. **10**(3): p. 031112-031112.
142. Stokes, R.J., et al., *Surface-enhanced Raman scattering spectroscopy as a sensitive and selective technique for the detection of folic acid in water and human serum*. Appl Spectrosc, 2008. **62**(4): p. 371-6.
143. Qian, X., et al., *In vivo tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced Raman nanoparticle tags*. Nat Biotech, 2008. **26**(1): p. 83-90.
144. Stuart, D.A., et al., *In Vivo Glucose Measurement by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*. Analytical Chemistry, 2006. **78**(20): p. 7211-7215.
145. Chen, J., et al., *A New Aptameric Biosensor for Cocaine Based on Surface-Enhanced Raman Scattering Spectroscopy*. Chemistry – A European Journal, 2008. **14**(27): p. 8374-8382.
146. He, Y., et al., *Silicon nanowires-based highly-efficient SERS-active platform for ultrasensitive DNA detection*. Nano Today, 2011. **6**(2): p. 122-130.
147. Li, M., et al., *Detection of Adenosine Triphosphate with an Aptamer Biosensor Based on Surface-Enhanced Raman Scattering*. Analytical Chemistry, 2012. **84**(6): p. 2837-2842.
148. Hu, J., et al., *Electrostatic Interaction Based Approach to Thrombin Detection by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*. Analytical Chemistry, 2008. **81**(1): p. 87-93.
149. Cho, H., et al., *Aptamer-Based SERRS Sensor for Thrombin Detection*. Nano Letters, 2008. **8**(12): p. 4386-4390.
150. Huh, Y.S. and D. Erickson, *Aptamer based surface enhanced Raman scattering detection of vasopressin using multilayer nanotube arrays*. Biosensors and Bioelectronics, 2010. **25**(5): p. 1240-1243.
151. Bi, L.Y., et al., *Bimetallic gold-silver nanoplate array as a highly active SERS substrate for detection of streptavidin/biotin assemblies*. Analytica Chimica Acta, 2013. **805**: p. 95-100.
152. Garrett, N.L., et al., *Spectroscopy on the wing: Naturally inspired SERS substrates for biochemical analysis*. Journal of Biophotonics, 2009. **2**(3): p. 157-166.
153. Turkevich, J., P.C. Stevenson, and J. Hillier, *A STUDY OF THE NUCLEATION AND GROWTH PROCESSES IN THE SYNTHESIS OF COLLOIDAL GOLD*. Discussions of the Faraday Society, 1951(11): p. 55-75.
154. Brust, M., et al., *SYNTHESIS OF THIOL-DERIVATIZED GOLD NANOPARTICLES IN A 2-PHASE LIQUID-LIQUID SYSTEM*. Journal of the Chemical Society-Chemical Communications, 1994(7): p. 801-802.
155. Podstawka, E., Y. Ozaki, and L.M. Proniewicz, *Adsorption of S-S containing proteins on a colloidal silver surface studied by surface-enhanced Raman spectroscopy*. Appl Spectrosc, 2004. **58**(10): p. 1147-1156.
156. Fischer, U.C. and H.P. Zingsheim, *SUB-MICROSCOPIC PATTERN REPLICATION WITH VISIBLE-LIGHT*. Journal of Vacuum Science & Technology, 1981. **19**(4): p. 881-885.

157. Deckman, H.W. and J.H. Dunsmuir, *NATURAL LITHOGRAPHY*. Applied Physics Letters, 1982. **41**(4): p. 377-379.
158. Hulteen, J.C., et al., *Nanosphere Lithography: Size-Tunable Silver Nanoparticle and Surface Cluster Arrays*. The Journal of Physical Chemistry B, 1999. **103**(19): p. 3854-3863.
159. Micheletto, R., H. Fukuda, and M. Ohtsu, *A Simple Method for the Production of a Two-Dimensional, Ordered Array of Small Latex Particles*. Langmuir, 1995. **11**(9): p. 3333-3336.
160. Haynes, C.L. and R.P. Van Duyne, *Nanosphere Lithography: A Versatile Nanofabrication Tool for Studies of Size-Dependent Nanoparticle Optics*. The Journal of Physical Chemistry B, 2001. **105**(24): p. 5599-5611.
161. Cui, Z., ed. *Nanofabrication: principles, capabilities and limits*. 2009, Springer.
162. Chou, S.Y., P.R. Krauss, and P.J. Renstrom, *IMPRINT OF SUB-25 NM VIAS AND TRENCHES IN POLYMERS*. Applied Physics Letters, 1995. **67**(21): p. 3114-3116.
163. Haisma, J., et al., *Mold-assisted nanolithography: A process for reliable pattern replication*. Journal of Vacuum Science & Technology B, 1996. **14**(6): p. 4124-4128.
164. Plachetka, U., et al., *Comparison of multilayer stamp concepts in UV-NIL*. Microelectronic Engineering, 2006. **83**(4-9): p. 944-947.
165. Barbillon, G., et al., *Gold nanoparticles by soft UV nanoimprint lithography coupled to a lift-off process for plasmonic sensing of antibodies*. Microelectronic Engineering, 2010. **87**(5-8): p. 1001-1004.
166. Alvarez-Puebla, R., et al., *Nanoimprinted SERS-Active Substrates with Tunable Surface Plasmon Resonances*. The Journal of Physical Chemistry C, 2007. **111**(18): p. 6720-6723.
167. Krauss, P.R. and S.Y. Chou. *Sub-10 nm imprint lithography and applications*. in *Device Research Conference Digest, 1997. 5th*. 1997.
168. WATT, F., et al., *ION BEAM LITHOGRAPHY AND NANOFABRICATION: A REVIEW*. International Journal of Nanoscience, 2005. **04**(03): p. 269-286.
169. Larkin, M.W. and R.K. Matta, *The electron beam fabrication of small geometry transistors*. Solid-State Electronics, 1967. **10**(5): p. 491-496.
170. Lamy de la Chapelle, M., et al., *New Gold Nanoparticles Adhesion Process Opening the Way of Improved and Highly Sensitive Plasmonics Technologies*. Plasmonics, 2013. **8**(2): p. 411-415.
171. Word, M.J., I. Adesida, and P.R. Berger, *Nanometer-period gratings in hydrogen silsesquioxane fabricated by electron beam lithography*. Journal of Vacuum Science & Technology B, 2003. **21**(6): p. L12-L15.
172. Cleary, A., et al., *Fabrication of double split metallic nanorings for Raman sensing*. Microelectronic Engineering, 2009. **86**(4-6): p. 1146-1149.
173. Le Ru, E.C., et al., *Surface enhanced Raman spectroscopy on nanolithography-prepared substrates*. Current Applied Physics, 2008. **8**(3-4): p. 467-470.
174. Laurent, G., et al., *Probing surface plasmon fields by far-field Raman imaging*. Journal of Microscopy, 2008. **229**(2): p. 189-196.
175. Anker, J.N., et al., *Biosensing with plasmonic nanosensors*. Nat Mater, 2008. **7**(6): p. 442-453.
176. Chen, C.-D., et al., *Sensing capability of the localized surface plasmon resonance of gold nanorods*. Biosensors and Bioelectronics, 2007. **22**(6): p. 926-932.
177. Barbillon, G., et al., *Biological and chemical gold nanosensors based on localized surface plasmon resonance*. Gold Bulletin, 2007. **40**(3): p. 240-244.
178. Park, J.-H., et al., *A regeneratable, label-free, localized surface plasmon resonance (LSPR) aptasensor for the detection of ochratoxin A*. Biosensors and Bioelectronics, 2014. **59**(0): p. 321-327.
179. K, K., et al., *Single molecule detection using surface-enhanced Raman scattering (SERS)*. Phys. Rev. Lett., 1997. **78**: p. 1667.
180. Wu, W., et al., *Cones fabricated by 3D nanoimprint lithography for highly sensitive surface enhanced Raman spectroscopy*. Nanotechnology, 2010. **21**(25).
181. Zuloaga, J. and P. Nordlander, *On the Energy Shift between Near-Field and Far-Field Peak Intensities in Localized Plasmon Systems*. Nano Letters, 2011. **11**(3): p. 1280-1283.
182. PJG, G. and A. RF, *Surface-enhancement of fluorescence near noble metal nanostructures*. Top. Fluoresc. Spectrosc., 2005. **8**: p. 223.
183. JT, G., et al., *A surface-enhanced hyper-Raman scattering study of pyridine adsorbed onto silver: experiment and theory*. J. Chem. Phys., 1988. **88**: p. 7942.
184. Alexander, T.A. and A.E. Wickenden, *Electron Beam Lithography (EBL) engineered nanostructures for biosensing*, in *Smart Medical and Biomedical Sensor Technology Ii*, B.M. Cullum, Editor 2004, Spie-Int Soc Optical Engineering: Bellingham. p. 78-86.
185. Chou, S.Y., P.R. Krauss, and P.J. Renstrom, *Nanoimprint lithography*. Journal of Vacuum Science & Technology B, 1996. **14**(6): p. 4129-4133.

186. -Labarthe, *SERS Detection of Streptavidin/Biotin Monolayer Assemblies*. Langmuir, 2011. **27**(4): p. 1494-1498.
187. Zheng, J., et al., *Surface-enhanced resonance Raman spectroscopic study of yeast iso-1-cytochrome c and its mutant*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2002. **530**(1-2): p. 75-81.
188. Turner, M., et al., *Tyrosine kinase SYK: essential functions for immunoreceptor signalling*. Immunology Today, 2000. **21**(3): p. 148-154.
189. Haes, A. and R. Duyne, *A unified view of propagating and localized surface plasmon resonance biosensors*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2004. **379**(7-8): p. 920-930.
190. Link, S., M.B. Mohamed, and M.A. El-Sayed, *Simulation of the Optical Absorption Spectra of Gold Nanorods as a Function of Their Aspect Ratio and the Effect of the Medium Dielectric Constant*. The Journal of Physical Chemistry B, 1999. **103**(16): p. 3073-3077.
191. Gabudean, A.M., D. Biro, and S. Astilean, *Localized surface plasmon resonance (LSPR) and surface-enhanced Raman scattering (SERS) studies of 4-aminothiophenol adsorption on gold nanorods*. Journal of Molecular Structure, 2011. **993**(1-3): p. 420-424.
192. Yu, C. and J. Irudayaraj, *Multiplex Biosensor Using Gold Nanorods*. Analytical Chemistry, 2006. **79**(2): p. 572-579.
193. Tian, L., et al., *Gold Nanorods as Plasmonic Nanotransducers: Distance-Dependent Refractive Index Sensitivity*. Langmuir, 2012. **28**(50): p. 17435-17442.
194. Huang, H., et al., *A novel label-free multi-throughput optical biosensor based on localized surface plasmon resonance*. Biosensors and Bioelectronics, 2009. **24**(7): p. 2255-2259.
195. Parab, H.J., et al., *A gold nanorod-based optical DNA biosensor for the diagnosis of pathogens*. Biosensors and Bioelectronics, 2010. **26**(2): p. 667-673.
196. Tan, T., et al., *LSPR-dependent SERS performance of silver nanoplates with highly stable and broad tunable LSPRs prepared through an improved seed-mediated strategy*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2013. **15**(48): p. 21034-21042.
197. McFarland, A.D., et al., *Wavelength-Scanned Surface-Enhanced Raman Excitation Spectroscopy*. The Journal of Physical Chemistry B, 2005. **109**(22): p. 11279-11285.
198. Dou, X.M., et al., *Surface-enhanced Raman scattering of biological molecules on metal colloid II: Effects of aggregation of gold colloid and comparison of effects of pH of glycine solutions between gold and silver colloids*. Appl Spectrosc, 1999. **53**(11): p. 1440-1447.
199. Bengter, H., C. Tengroth, and S.P. Jacobsson, *New light on Ag-colloid preparation for surface-enhanced FT-Raman spectroscopy: the role of aggregation*. Journal of Raman Spectroscopy, 2005. **36**(11): p. 1015-1022.
200. Oran, J.M., et al., *Nanofabricated periodic arrays of silver elliptical discs as SERS substrates*. Journal of Raman Spectroscopy, 2008. **39**(12): p. 1811-1820.
201. Gunnarsson, L., et al., *Interparticle coupling effects in nanofabricated substrates for surface-enhanced Raman scattering*. Applied Physics Letters, 2001. **78**(6): p. 802-804.
202. Gopinath, A., et al., *Deterministic aperiodic arrays of metal nanoparticles for surface-enhanced Raman scattering (SERS)*. Optics Express, 2009. **17**(5): p. 3741-3753.
203. Drachev, V.P., et al., *Surface-Enhanced Raman Difference between Human Insulin and Insulin Lispro Detected with Adaptive Nanostructures*. The Journal of Physical Chemistry B, 2004. **108**(46): p. 18046-18052.
204. Moger, J., et al., *Feasibility study using surface-enhanced Raman spectroscopy for the quantitative detection of tyrosine and serine phosphorylation*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2007. **1770**(6): p. 912-918.

Les protéines jouent un rôle important dans les cellules, *via* leur activité enzymatique et les interactions qu'elles mettent en jeu. Ces fonctions sont principalement basées sur la structure des protéines. Afin de détecter leur présence, et de caractériser leur structure, nous nous sommes appuyés sur les propriétés optiques des nanostructures. La résonance des plasmons de surface localisés (RPSL), ainsi que la diffusion Raman exaltée de surface (DRES), nous ont permis de détecter différentes protéines. Une optimisation des nanostructures nous a également permis de concevoir un biocapteur basé sur la DRES, qui soit sensible, reproductible et spécifique. En effet, la détection spécifique d'un biomarqueur pathologique, la protéine Manganèse SuperOxide Dismutase (MnSOD), a été réalisée grâce à l'utilisation de nanostructures optimisées et fonctionnalisées avec un aptamère (séquence ADN). Avec ce système, nous avons démontré la détection de la MnSOD à des concentrations physiologiques dans des fluides corporels comme le sérum et la salive. Enfin, l'étude de la structure de la protéine Spleen Tyrosine kinase (Syk), par DRES, nous a permis de mettre en évidence un réarrangement structural de Syk lors de sa phosphorylation. Une étude complémentaire par Western Blot montre que son activité kinase est dépendante de son état de phosphorylation indiquant que la structure et l'activité de Syk sont liées. L'ensemble de ces travaux contribue à une meilleure connaissance de l'interface entre la physique et la biologie.

Optimization of plasmonics nanostructures for detection and characterization of proteins structure by Surface Enhanced Raman Scattering

Proteins play an important role in cells *via* their enzymatic activity and their interactions. Their functions are mainly based on the protein structure. In order to detect their presence and to characterize their structure, we used optical properties of nanostructures. The localized surface plasmon resonance (LSPR), as well as the surface enhanced Raman scattering (SERS), allowed us to detect various proteins. We also optimized nanostructures to build a sensitive, reproducible and specific biosensor based on SERS. Indeed, specific detection of one pathological biomarker, the Manganese SuperOxide Dismutase (MnSOD) protein, was investigated by using optically optimized and aptamer-functionalized nanostructures. Using this system, we were able to detect the MnSOD at physiological concentration in body fluids, such as serum and saliva. Finally, the structural study of the Spleen Tyrosine kinase (Syk) protein by SERS, allowed us to demonstrate that its structure varied with its phosphorylation levels. A complementary Western Blot analysis showed that the Syk kinase activity depended also on its phosphorylation state, meaning that the structure and the activity of Syk were linked. Altogether, these data contributed to a better understanding of the interface between physics and biology.

Discipline: Physique

Mots clés: protéine, biocapteur, phosphorylation, diffusion Raman exaltée de surface, plasmonique, étude structurale

Intitulé et adresse des laboratoires: ASIH (Adaptateurs de Signalisation en Hématologie), CSPBAT (Chimie, Structures et Propriétés de Biomatériaux et d'Agents Thérapeutiques), UFR SMBH, 74 rue Marcel Cachin, 93017 Bobigny